Aus dem Zentrum für Lebensmittelwissenschaften

Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch

der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Beziehungen zwischen Eutergesundheit und Funktionalität von aus Blut und Milch isolierten Leukozyten des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der Chemilumineszenz

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin

der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Roswitha Merle

aus Fürth

Hannover 2003

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Dr. Jörn Hamann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Jörn Hamann

2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Martin Kaske

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2003

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH gefördert.

Meinen Eltern und meinem Sohn
in Liebe gewidmet

Roswitha Merle: Beziehungen zwischen Eutergesundheit und Funktionalität von aus Blut und Milch isolierten Leukozyten des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der Chemilumineszenz

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeines:

A. monodest.	Aqua monodestillata
A. tridest.	Aqua tridestillata
BAP	Blutagarplatte
BSA	bovines Serumalbumin
E. coli	*Escherichia coli*
Eos B	Anteil Eosinophiler Granulozyten im Blutausstrich in %
k	Korrelationskoeffizient
LF	elektrische Leitfähigkeit in mS / cm
Lym B	Anteil Lymphozyten im Blutausstrich in %
Lym M	Anteil Lymphozyten in der Milch-Zellsuspension in %
Makro M	Anteil Makrophagen in der Milch-Zellsuspension in %
n	Stichprobengröße
NAGase	NAGase in nmol $\times$ min^{-1} $\times$ ml^{-1}
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMN B	Anteil PMN im Blutausstrich in %
PMN M	Anteil PMN in der Milch-Zellsuspension in %
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SCC	Anzahl somatischer Zellen / ml Milch im VAG
sd	Standardabweichung
Tps	Tagesprobensatz, umfasst die Blut- und Milchdaten eines Tieres von einem Untersuchungstag
VAG	Viertelanfangsgemelk
VGH	Viertelhandgemelk
Vitalität	Prozentsatz vitaler Zellen in der Milch-Zellsuspension
WBC	Leukozytenzahl in 10^6 / ml
X	arithmetischer Mittelwert

Phagozytose:

% n	Prozentsatz aktiver Zellen der nicht opsonisierten Proben bei der Phagozytose (s. 3.6.7)
% o	Prozentsatz aktiver Zellen der opsonisierten Proben bei der Phagozytose (s. 3.6.7)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MFI n	mittlere Fluoreszenzintensität (geometrisches Mittel) der nicht opsonisierten Proben bei der Phagozytose
MFI o	mittlere Fluoreszenzintensität (geometrisches Mittel) der opsonisierten Proben bei der Phagozytose

Chemilumineszenz:

CL	Chemilumineszenz
CL-Aktivität B	CL-Einheiten / 1 Mio. PMN in der Blut-Zellsuspension
CL-Aktivität M	CL-Einheiten / 1 Mio. PMN in der Milch-Zellsuspension
DPBS	Dulbecco´s PBS
DMSO	Dimethylsulfoxid
NTB-Reduktion	Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion
Max	Maximum der Kurve der CL-Messung in RLU (relative light units)
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
RL	Reaktionslösung
RLU	Relative Light Units
Time	Zeit bis zum Erreichen des Maximums in Sekunden

1. Einleitung

Der Zellgehalt der Milch wird seit langem zur Beurteilung der Eutergesundheit herangezogen. Dabei wird ein Zellgehalt bis 100.000 Zellen / ml Milch einer Viertelgemelksprobe als Grenzwert betrachtet. Liegt der Zellgehalt darunter, so wird das betreffende Euterviertel als normal sezernierend beurteilt, liegt er darüber, so gilt das Euterviertel als erkrankt.

Neben der Gesamtzellzahl in der Milch ist das Differentialzellbild und die Aktivität der Zellen im Euter für eine differenziertere Aussage über die Gesundheit des Euters bedeutsam. Während einer Infektion verändert sich das Zellbild im Euter drastisch. Ein starker Zustrom v. a. von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in das Gewebe führt schon vor dem Auftreten von klinischen Symptomen zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der Milch.

Die Differenzierung der Zellarten in der Milch ist ein wichtiger Ansatz, um Informationen über die Eutergesundheit zu erhalten. In der Tat sind aber nur vitale Zellen zur Infektionsabwehr fähig, wobei zu beachten ist, dass auch lebende Zellen unterschiedliche Reaktionsfähigkeiten haben. Eine Möglichkeit, die Aktivität von Zellen zu erfassen, ist die Messung der Chemilumineszenz (CL). Mit diesem Verfahren wird die Bildung der reaktiven Sauerstoffmetaboliten in PMN gemessen, die eine besondere Fähigkeit dieser Zellen im Rahmen der Abwehr darstellt. Sauerstoffradikale greifen die Bakterienwand an und zerstören damit die Bakterien. Im Rahmen der Chemilumineszenzreaktion werden die gebildeten Sauerstoffmetaboliten, speziell Hydrogenperoxid, in Licht umgesetzt, welches vom Luminometer erfasst wird. Dieser Wert ermöglicht eine Aussage über die Reaktionsbereitschaft der PMN, die im Zusammenhang mit Mastitiden üblicherweise erhöht ist.

Die Messung der CL-Aktivität von PMN aus dem Blut ist ein bekanntes Verfahren. Im Rahmen dieses Promotionsvorhabens wurde die CL-Aktivität von aus Milch isolierten PMN gemessen, was im Falle einer Mastitis Informationen über die Entzündungsreaktion im Gewebe lieferte. Die starke Variabilität dieses Parameters durch technische Einflüsse der Probengewinnung und -behandlung wie auch durch biologische Ein-

flüsse (z. B. Stoffwechsel, Hormonstatus, Arzneimittel) erschwerten jedoch bisher eine Etablierung des Verfahrens.

Parallel zur Beurteilung des lokalen Abwehrgeschehens im Euter wurde anhand von Blutuntersuchungen der allgemeine Gesundheitszustand des Tieres erfasst. Aus diesem Grund wurden auch PMN aus Blutproben isoliert und auf ihre Aktivität hin untersucht. Weitere Blutparameter wurden als Information über den Allgemeinzustand des Tieres ebenfalls erhoben.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ein genaueres Verständnis über die immunologischen Abläufe während einer Mastitis zu erlangen. Dabei wurde einerseits die Entwicklung funktioneller Parameter wie das Zelldifferentialbild, die Phagozytose- und die CL-Aktivität von aus Blut und Milch isolierten Zellen im Zusammenhang mit steigender Anzahl somatischer Zellen verfolgt. Ebenfalls wurde untersucht, in welchem Zellzahlbereich Tiere als eutergesund bezeichnet werden können bzw. mit welchem Zellgehalt die Veränderungen der immunologischen Parameter darauf hindeuten, dass eine gestörte Euterfunktion vorliegt. Solche Informationen können hilfreich sein, um Konzepte für die Mastitisprävention zu entwickeln.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Arbeit bestand darin, den Einfluss erkrankter Euterviertel auf die nicht betroffenen Viertel derselben Tiere hinsichtlich der Zellfunktionalität zu überprüfen.

Da die genannten Parameter der Zellaktivität Informationen über den Gesundheitszustand der Euterviertel bieten, die über die der Zellzahl hinausgehen, wurde versucht, für diese Parameter Grenzwerte zur Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Eutervierteln festzulegen.

2. Literaturübersicht

2.1 Mastitis – Ursachen und Diagnostik

2.1.1 Ursachen und Einteilung

Die Mastitis ist eine Entzündung des Euters. Ihre Ursachen sind vielfältig, wobei häufig bakterielle Besiedlung und Infektionen mit Pilzen nachgewiesen werden (TOLLE 1975). Unter den bakteriellen Erregern zählen *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus dysgalactiae* zu den klassischen Vertretern. Die Liste der Bakterien, die Mastitiden hervorrufen oder aufrechterhalten, ist jedoch lang (GRUNERT 1996).

Es ist anzunehmen, dass es in der Regel dem Zusammenwirken mehrerer auslösender Faktoren (Stress, Haltungs- und Fütterungsmängel, mangelnde Melkhygiene etc.) bedarf, um eine Mastitis zu verursachen (TOLLE 1975; HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Die Euterentzündung liegt entweder in subklinischer oder in klinischer Form vor. Die klinische Mastitis ist durch Merkmale wie Flocken in der Milch, Schwellung, Wärme des Euterviertels und evtl. Fieber gekennzeichnet. Je nach Schwere wird zwischen gering-, mittel- und hochgradigen Mastitiden unterschieden, je nach Dauer der Erkrankung zwischen akuten, subakuten und chronischen Formen (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Der subklinischen Mastitis fehlen diese grobsinnlich erfassbaren Symptome, sie zeichnet sich durch eine erhöhte Zellzahl (s. u.) und einen bakteriologisch positiven Befund aus (HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Ist nur die Zellzahl erhöht, ohne dass pathogene Bakterien nachgewiesen werden, so wird von einer unspezifischen Mastitis gesprochen (s. Tabelle 1). Der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen ohne erhöhten Zellgehalt stellt hingegen eine latente Infektion dar (TOLLE 1975; HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Tabelle 1: Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde im Rahmen der Mastitis-Kategorisierung (HAMANN u. FEHLINGS 2002)

Zellgehalt pro ml Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
< 100.000	normale Sekretion	latente Infektion
> 100.000	unspezifische Mastitis	Mastitis

Während einer Mastitis, auch einer subklinischen Mastitis, ändert sich die Komposition der Milchinhaltsstoffe. Die Milchleistung sowie der Fett- und Eiweißgehalt sinken, aber auch die Zusammensetzung der Elektrolyte verändert sich (KITCHEN 1981). Dies führt zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen in der Milchproduktion (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Hinzu kommen Verluste durch vorzeitigen Abgang erkrankter Tiere und Tierarztkosten (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Daher hat die Vermeidung von Mastitiden in der Milchkuhhaltung oberste Priorität.

2.1.2 Verfahren zum Entzündungsnachweis

Es gibt eine lange Reihe von Parametern, die sich in Milch im Zusammenhang mit einer Mastitis messbar verändern (GRABOWSKI 2000). Im Folgenden sind die in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Parameter näher beschrieben.

2.1.2.1 Anzahl somatischer Zellen

Die Zahl der somatischen Zellen in der Milch hat einen hohen Aussagewert hinsichtlich des Gesundheitsstatus eines Euterviertels. Dringen pathogene Mikroorganismen in das Euter ein, so wird eine immunologische Reaktion ausgelöst. Ein Teil dieser Reaktion ist der Zufluss von Abwehrzellen in das betroffene Euterviertel. Als physiologisch werden Zellgehalte von 20.000 bis 50.000 Zellen / ml Milch angesehen, mit einem Schwankungsbereich bis 100.000 Zellen / ml Milch (HAMANN u. REICHMUTH 1990; HAMANN 1992; HAMANN u. FEHLINGS 2002). Liegt die Zell-

zahl über 100.000 Zellen / ml Milch, so kann nicht mehr von normaler Sekretion gesprochen werden, sondern es liegt ein Entzündungsgeschehen vor, welches wiederum sinkende Milchleistung und Änderung der Milchinhaltsstoffe zur Folge hat (HAMANN 1995; SCHÜTTEL 1999; GRABOWSKI 2000).

Rasse, Alter, Laktationsstadium und verschiedene Stressfaktoren nehmen ebenfalls Einfluss auf die Zellzahl in der Milch. Diese physiologischen Parameter verändern die Zellzahl entweder direkt oder indirekt, indem sie die Abwehrleistung des Tieres verändern (REICHMUTH 1975). Auch das Melkintervall lässt die Zellzahlen schwanken: Mit einem Melkintervall von 4 Stunden liegt die Zellzahl im Viertelanfangsgemelk signifikant höher als mit einem Melkintervall von 12 Stunden (HAMANN et al. 1997).

Stress alleine führt zu keiner signifikanten Zellzahlerhöhung (HAMANN 1992). Insofern ist die Grenze zwischen physiologischen und pathologischen Zellzahlschwankungen nicht deutlich zu ziehen, weil nur ein durch Bakterien vorgeschädigtes Euter durch „physiologische“ Stressoren eine klinische Mastitis ausbilden wird (HAMANN u. REICHMUTH 1990).

Da die Anzahl somatischer Zellen ein geeigneter Indikator zur Feststellung von Entzündungsvorgängen im Euter ist, gibt es eine Reihe von Verfahren, mit denen die Zellzahl einer Milchprobe festgestellt werden kann. Die am weitesten verbreitete Methode zur Zellzählung ist die der Fossomatic®. Es handelt sich hierbei um ein fluoreszenzoptisches Verfahren (SCHMIDT MADSEN 1975), in dem die Milchprobe zunächst mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt und anschließend im Gerät Fossomatic® gemessen wird. Jeder gefärbte (fluoreszierende) Partikel wird als elektrischer Impuls empfangen. Auf diese Weise kann die Zellzahl in 1.000 pro ml ermittelt werden (SCHRÖDER 2003).

2.1.2.2 Elektrische Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit ist ein Maß für die Konzentration und Beweglichkeit der Ionen, die in der Milch dissoziiert vorliegen (v. a. Chlorid-, Kalium- und Natrium-Ionen). Ihre Maßeinheit ist Millisiemens / cm (mS/cm). Gesunde Milch enthält eine höhere Kaliumkonzentration, aber eine niedrigere Natrium- und Chloridkonzentration

als das Blut. Das jeweilige Konzentrationsgefälle wird durch die Blut-Milch-Schranke aufrechterhalten. Ist diese geschädigt, so gleichen sich die Konzentrationen der Ionen in der Milch denen des Blutes an (HAMANN u. ZECCONI 1998), und die elektrische Leitfähigkeit steigt.

Da die elektrische Leitfähigkeit von vielen Faktoren (Laktationsstadium, Fütterung und Rasse) beeinflusst wird, muss ihre Interpretation vorsichtig vorgenommen werden. Der Fettgehalt der Milch spielt ebenfalls eine Rolle, da die Ionenbeweglichkeit durch die Fettmicellen eingeschränkt wird. Die elektrische Leitfähigkeit kann als orientierende Information über die Eutergesundheit genutzt werden, da sie, im Gegensatz zu den meisten anderen Entzündungsparametern, bereits im Stall schnell und einfach bestimmt werden kann. Hierbei dient vor allem ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen der einzelnen Viertel einer Kuh als Hinweis auf ein Krankheitsgeschehen. Eine sichere Diagnose kann jedoch nur zusammen mit anderen Parametern erhoben werden (HAMANN u. ZECCONI 1998; GRABOWSKI 2000). Als orientierender Referenzwert für das Sekret eutergesunder Kühe kann der Bereich von 4,8 – 6,2 mS / cm angesehen werden (HAMANN & FEHLINGS 2002).

Die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit kann mit Handgeräten („Cow side test") oder durch Sensoren in der Melkmaschine erfolgen (SCHULTZE 1985).

2.1.2.3 N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase (NAGase)

N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase (NAGase) ist ein Enzym, das von den Leukozyten produziert und in deren Lysosomen gespeichert wird. Es ist an der Abwehr von Infektionserregern beteiligt. 1,1 bis 2,8 nmol ml^{-1} min^{-1} in Milch gelten als Referenzbereich (SCHÜTTEL 1999). Während einer Infektion wird vermehrt NAGase freigesetzt. Da dies nur lokal geschieht, ist die Bestimmung der Enzymaktivität zur Mastitisdiagnostik besonders aussagekräftig.

Die Messung der NAGase-Aktivität erfolgt wiederum fluoreszenzoptisch im Mikrotiterplattenverfahren. Das Ergebnis wird in nmol ml^{-1} min^{-1} angegeben (SCHÜTTEL 1999).

2.2 Somatische Zellen in der Milch

2.2.1 Zellarten

In Milch finden sich verschiedene Zellarten, deren Morphologie im mikroskopischen Zellausstrich in der Dissertation von SCHRÖDER (2003) ausführlich beschrieben wurde. In Tabelle 2 sind Größe und Aussehen der Zellen kurz dargestellt.

Tabelle 2: Zellmorphologie von Milchzellen (SCHRÖDER 2003)

Zellart	Größe	Kern	Zytoplasma
PMN	10 – 14 µm	intensiv gefärbt, stabförmig oder gelappt	dichte neutrophile Granula; 0,5 – 1 µm
Eosinophile Granulozyten	10 – 14 µm	intensiv gefärbt, stabförmig oder gelappt	eosinophile Granula; 0,5 – 1,5 µm
Basophile Granulozyten	9 – 12 µm	intensiv gefärbt, stabförmig oder gelappt	basophile Granula; 1,5 µm
Lymphozyten/ Blasten	5 – 10 µm bis 25 µm	intensiv gefärbt, rund bis oval	sehr wenig, intensiv gefärbt
Makrophagen	8 – 30 µm	schwach gefärbt, vielfältige Formen	schwach gefärbt, oft nicht angefärbte Vakuolen
Epithelzellen	10 – 14 µm	intensiv gefärbt, groß und rund	schwach gefärbt, nicht angefärbte Vakuolen möglich

Während polymorphkernige Granulozyten (PMN), eosinophile und basophile Granulozyten sowie Lymphozyten Abwehrzellen sind, die direkt aus dem Blut stammen, sind Makrophagen als gewebsständige Zellen nicht im Blut zu finden (KRAFT u. DÜRR 1997). Ihre Vorläufer sind Monozyten, die im Knochenmark gebildet werden, mit dem Blut an ihren Bestimmungsort gelangen und dort zu Makrophagen reifen (KLINKE u. SILBERNAGL 1994). Epithelzellen entstehen im Gewebe durch Zellteilung.

2.2.2 Zelldifferentialbild

PAAPE et al. (1981a) haben folgende Differenzierung der somatischen Zellen in Milch aufgestellt: 60 % Makrophagen, 28 % Lymphozyten, 10 % PMN und 2 % Epithelzellen. Diese Zahlen beziehen sich auf eine durchschnittliche Verteilung der Zellarten in Milch aus gesunden Eutervierteln. Sie unterliegen individuellen, laktations- und altersbedingten Schwankungen (REICHMUTH 1975; BURVENICH et al. 1995).

Tabelle 3: Zelldifferentialbild in Milch einer gesunden Milchdrüse (nach SCHRÖDER 2003)

Zellart / Quelle	MAK	LYM	PMN	EPI
Lee et al. 1980	80 %	16 %	3 %	1 %
Paape et al. 1981a	60 %	28 %	10 %	2 %
Kurzhals et al. 1985	63 %	2 %	34 %	2 %
Fox et al. 1985	51 %	12 %	32 %	
Wever u. Emanuelson 1989	48 %	15 %	37 %	
Miller et al. 1991	30 %	24 %	26 %	19 %
Östensson 1993	74 %	14 %	12 %	
Leitner et al. 1999	13 %	3,4 %	29 %	45 %
Dosogne et al. 2003	10 %	58 %	28 %	
Schröder 2003	39 %	25 %	34 %	

Tabelle 3 (nach SCHRÖDER 2003) zeigt eine Übersicht über die veröffentlichten Untersuchungen zu Zelldifferentialbildern verschiedener Autoren. Es ist ersichtlich, dass zwischen den Ergebnissen der einzelnen Untersucher hohe Schwankungen bestehen. So liegt nach LEE et al. (1980) der Schwerpunkt der Zellverteilung noch stärker auf Seiten der Makrophagen, hier erfolgt auch der Hinweis auf Makrophagen, die nach dem Zentrifugieren mit der Fettschicht entfernt werden. Die Studie von KURZ-

HALS et al. (1985) weist einen wesentlich höheren PMN-Anteil nach als die Studien anderer Autoren; nach LEITNER et al. (1999) überwiegen die Epithelzellen.

Erkrankt ein Euterviertel, so kommt es zu einem raschen massiven Einstrom von PMN aus dem Blut in die Milch, sodass der Anteil PMN 90 % und mehr betragen kann (JAIN 1976; PAAPE et al. 1979; CONCHA 1986; BURVENICH et al. 1995).

2.2.3 Zelluläre Abwehr

2.2.3.1 Allgemeines

Allgemein wird die Abwehr in zwei Gruppen eingeteilt: die zelluläre und die humorale Abwehr (CRAVEN u. WILLIAMS 1985; ZECCONI et al. 1994). Der zelluläre Teil besteht aus Immunzellen, die humorale Abwehr aus nicht-zellulären Komponenten, die Einfluss auf das Infektionsgeschehen nehmen, indem sie z. B. Abwehrzellen aktivieren oder hemmen, eine Ansammlung von Lymphflüssigkeit bewirken (Schwellung) und vieles mehr. Zur humoralen Abwehr gehören u. a. Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems und Interleukine.

Im gesunden Euterviertel sind stets sowohl Abwehrzellen als auch humorale Bestandteile vorhanden. Im Falle einer Mastitis steigt der Gehalt somatischer Zellen und auch der bestimmter Mediatoren. Außerdem ändert sich die Zusammensetzung dieser Botenstoffe, d. h. einige Teile überwiegen in bestimmten Phasen der Entzündung (RIOLLET et al. 2000).

2.2.3.2 Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut

In Milch aus einem gesunden Euterviertel stellen Makrophagen nach Angabe der meisten Autoren den größten Anteil der Zellpopulation dar (z. B. PAAPE et al. 1981a; KURZHALS et al. 1985; WEVER u. EMANUELSON 1989). Ihre vorrangige Funktion ist die Phagozytose und Abtötung von Bakterien (PAAPE et al. 1979; BURVENICH et al. 1994). Werden sie stimuliert, setzen sie chemotaktische Faktoren frei, die PMN anlocken. Während einer Untersuchung über die Reaktion bestimmter Mediatoren

und der Entzündungszellen auf eine artifizielle Euterinfektion brach zwölf Stunden nach der Inokulation von 30 CFU *Escherichia coli* (*E. coli)* in ein Euterviertel die Blut-Milch-Schranke zusammen, gefolgt von Fieber und einem erhöhten Leukozyteneinstrom (SHUSTER et al. 1997). Unter den Mediatoren wurden zunächst die Komplementkomponente C5a, der Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1), später IL-6 und IL-8 produziert. Diese Stoffe fördern den Einstrom von PMN, indem sie zunächst die Endothelzellen aktivieren, vermehrt E-Selektin und P-Selektin zu exprimieren. Dadurch können PMN leichter an die Endotheloberfläche binden. Auf den PMN wird nun das Molekül Mac-1 (auch CD11b/CD18 genannt) exprimiert, das wiederum für eine feste Bindung zwischen Endothel und Zelle sorgt (ARNAOUT 1990; RIOLLET et al. 2000; SMITS et al. 2000). Das Endothel bildet hierfür den Rezeptor ICAM-1 (intercellular adhesion molecule – 1) aus (ROTHLEIN et al. 1986). Nun können die PMN entlang des Konzentrationsgradienten der Chemokine durch das Endothel, das Interstitium und das Euterepithel in die Milch wandern (SMITS et al. 2000). Eines der stärksten Chemokine ist Interleukin-8 (HUBER et al. 1992; SHUSTER et al. 1996). Aber auch Endotoxin, Interleukin-1ß oder die Komplementkomponente C5a zeigen starke chemotaktische Wirkung auf PMN (PERSSON et al. 1993).

2.2.3.3 Opsonine

Opsonine sind Botenstoffe, die die Phagozytose von Bakterien durch PMN oder Makrophagen unterstützen. Zu ihnen gehören Immunglobuline und bestimmte Komponenten des Komplementsystems (BURVENICH et al. 1995).

Immunglobuline sind stets in der Milch vertreten. Ihre Konzentration steigt im Rahmen einer Mastitis an. Besonders IgG_2 und IgM aktivieren die Abwehrzellen zur Phagozytose (MILLER et al. 1988). Die Verteilung in Kolostrum beträgt etwa 85 – 90 % IgG, 7 % IgM und ca. 5 % IgA, wobei vermutlich der größere Teil des IgA nicht frei, sondern an die Fettkügelchenmembran gebunden vorliegt (CRAVEN u. WILLIAMS 1985).

Komplement ist besonders in Kolostrum und in Milch aus entzündeten Eutervierteln vorhanden. Die Komplementkomponente C3 liegt in der Mittellaktation in einer Se-

rumkonzentration von 1 – 5 % im Milchserum vor, im Falle einer Mastitis steigt die Konzentration auf 3 – 12 % (CRAVEN u. WILLIAMS 1985). Die Komplementkomponente C3b fördert die Phagozytoseaktivität von PMN (PAAPE et al. 1985).

2.2.3.4 Makrophagen

Makrophagen gehören zusammen mit den PMN zu den funktionellen Phagozyten im Euter (JAIN 1976; PAAPE et al. 1981a). Es sind sehr große Zellen, die meist Fettvakuolen enthalten (OUTTERIDGE u. LEE 1981). Sie sind gewebsständig, kommen aber auch in der Milch selbst vor. Ihre Hauptaufgaben sind die Phagozytose von Fremdpartikeln und die Rekrutierung anderer Immunzellen durch die Produktion bestimmter Mediatoren (Chemokine, s. Abschnitt 2.2.3.2). Weiterhin produzieren auch sie Sauerstoffradikale, jedoch in geringerem Umfang als die PMN (ALLEN u. LOOSE 1976; OUTTERIDGE u. LEE 1981). In Makrophagen aus Milchzellsuspensionen konnte die Bildung von Hydrogenperoxid nachgewiesen werden (MULLAN et al. 1986). Andere Autoren stellten fest, dass Makrophagen weder Myeloperoxidase besitzen noch Sauerstoffradikale bilden (HALLÉN SANDGREN et al. 1991; MEHRZAD 2002).

In der Trockenstehzeit scheinen die Makrophagen verstärkt Fett und Kasein zu phagozytieren, Milchreste und untergegangene Zellen aufzunehmen und damit zur Rückbildung des Euters beizutragen (OUTTERIDGE u. LEE 1981; FOX et al. 1988).

2.2.3.5 PMN

Im Falle einer bakteriellen Invasion strömen PMN, durch die Mediatoren angelockt, in Massen in das Euter ein. Die Hauptaufgabe der PMN in Milch ist die Abtötung von Bakterien. Hierfür stehen ihnen die Phagozytose (Aufnahme von Bakterien) und die Freisetzung verschiedener Reagenten zur Verfügung. Generell wird zwischen sauerstoffabhängigen und sauerstoffunabhängigen Reaktionen unterschieden. Die sauerstoffabhängigen Reaktionen werden unter dem Begriff „Respiratory Burst“ zusammengefasst und in einem eigenen Kapitel beschrieben (s. Abschnitt 2.3.2). Als sauerstoffunabhängiges System werden verschiedenartige Proteine bezeichnet, die

mikrobizid wirken. Dazu gehören u. a. Lysozym, Laktoperoxidase, Laktoferrin und kationische Proteine (TARGOWSKI 1983; CRAVEN u. WILLIAMS 1985; PAAPE et al. 1985; SORDILLO et al. 1997). Welches der beiden Systeme wirksam ist, hängt von dem jeweiligen Bakterium ab, das angegriffen wird (CRAVEN u. WILLIAMS 1985).

PMN haben drei verschiedene Arten von Granula: In den primären (azurophilen) Granula werden lysosomales Protein und einige Komponenten der sauerstoffabhängigen Reaktionen wie Myeloperoxidase gespeichert (COORAY et al. 1993; ZECCONI et al. 1994), in den sekundären (spezifischen) Granula werden hauptsächlich Lysozym und Laktoferrin gelagert (ZECCONI et al. 1994). 1983 wurde eine neue Population von Granula in bovinen PMN entdeckt, in denen Enzyme der sauerstoffunabhängigen Reaktionen gespeichert werden (GENNARO et al. 1983).

PMN in Milch enthalten 38 % weniger Glykogen als solche aus dem Blut (NAIDU u. NEWBOULD 1973). Die Ursachen hierfür liegen auf der Hand: Alle Vorgänge wie z. B. Diapedese (VANGROENWEGHE et al. 2001) und Phagozytose (PAAPE et al. 1979) verbrauchen Glucose. In Milch stehen nur geringe Glucosekonzentrationen zur Verfügung, sodass die PMN in der Milch nach und nach ihre Glykogenreserven aufbrauchen und schließlich zugrunde gehen (NEWBOULD 1970, 1973). Als Bestätigung dafür wurde eine Untersuchung über den Vorgang der Diapedese von PMN aus dem Kapillarendothel durch das Euterepithel in die Milch durchgeführt (SMITS et al. 1999). Dabei wurde festgestellt, dass die Diapedese die Kapazität der PMN zur Phagozytose und zum Respiratory Burst senkt.

2.2.3.6 Lymphozyten

Lymphozyten regulieren die Immunantwort auf ein Antigen. Jeder Lymphozyt ist für ein spezifisches Antigen sensibel. Bekommt er Kontakt zu diesem Antigen, so wird eine Reihe von immunologischen Reaktionen in Gang gesetzt, zu denen auch die Produktion von Immunglobulinen gehört. B- und T-Lymphozyten haben hierbei unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen (TARGOWSKI 1983). In der Milch sind die T-Zellen für zellverbundene Immunreaktionen verantwortlich, während die B-Zellen Antikörper

produzieren. Die Lymphozytenanteile in der Milch betragen etwa 50 % T-Lymphozyten und ca. 20 % B-Lymphozyten (CONCHA et al. 1978; TARGOWSKI 1983), wobei diese Zahlen stark variieren.

2.3 Funktionelle Eigenschaften von PMN

2.3.1 Phagozytose

2.3.1.1 Erkennung

Um von PMN phagozytiert werden zu können, müssen einige Bakterienarten opsonisiert sein. Dies geschieht durch Anlagerung von Immunglobulinen (v. a. IgG_2 und IgM) oder von Komplementkomponenten (besonders C3b und C3bi) an die Bakterien (CRAVEN u. WILLIAMS 1985; BURVENICH et al. 1995). Diese Opsonine lagern sich mit ihrem Endstück an ihre komplementären Rezeptoren der PMN an und erleichtern dadurch die Phagozytose.

Eine Reihe von Bakterien und anderen Partikeln wie z. B. Pilze, Parasiten, Latex- oder Carbonpartikel werden von den PMN auch ohne Opsonisierung als körperfremd erkannt (TARGOWSKI 1983).

2.3.1.2 Ingestion

Opsonisierte Teilchen binden über die Endstücke der Immunglobuline bzw. die C3b-Rezeptoren an die Zellen. Nicht opsonisierte Partikel werden entweder auch über die o. g. Rezeptoren oder über spezifische Rezeptoren erkannt und gebunden (TARGOWSKI 1983). Ist der Partikel einmal an die Zelle gebunden, so folgt der Akt der Ingestion. Dabei bilden sich Pseudopodien um den Partikel herum aus, bis er vollständig von der Zellmembran umgeben ist. Die entstehende Vakuole, Phagosom genannt, fusioniert mit einem Lysosom zum Phagolysosom. Darin wird das Bakterium getötet und verdaut. Zum Abtöten stehen die bereits erwähnten sauerstoffunabhängigen bzw. sauerstoffabhängigen Enzymsysteme zur Verfügung (TARGOWSKI 1983).

2.3.1.3 Reifestadien, die zur Phagozytose befähigt sind

Die verschiedenen Reifestadien von PMN aus dem Blut unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Phagozytosekapazität: Segmentkernige PMN, stabkernige PMN und Metamyelozyten betreiben Phagozytose, Myelozyten jedoch kaum. Promyelozyten und Myeloblasten sind dazu gar nicht in der Lage (SILVA et al. 1989).

2.3.2 Respiratory Burst

Der Respiratory Burst ist eine Gruppe chemischer Reaktionen, die als sauerstoffabhängige Abwehrmechanismen der PMN zusammengefasst werden. Sie sind eine Folge der Aktivierung von PMN durch Mediatoren wie z. B. die Komplementkomponente C3b. Einhergehend mit der Phagozytosereaktion werden durch die entstehenden Sauerstoffradikale die aufgenommenen Bakterien abgetötet (KWON 1987).

Nur reife PMN sind zum Respiratory Burst befähigt (GLASSER u. FIEDELEIN 1987). Die Reaktion beginnt wenige Sekunden nach dem Kontakt mit einem Stimulus und ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der Sauerstoffaufnahme (ROSSI u. ZATTI 1964; BABIOR 1984). Auslösen können den Respiratory Burst Partikel wie Bakterien, Viren oder Zellreste, aber auch lösliche Faktoren wie chemotaktische Peptide, Komplementkomponenten, Fettsäuren, Ca^{2+}-Ionophore, Phorbolester und Endotoxin (ROSSI 1986).

Die chemischen Reaktionen sind in Tabelle 4 und in Abbildung 1 dargestellt (BABIOR 1984).

Tabelle 4: Chemische Reaktionen des Respiratory Burst	
Reaktion	**Enzym**
$2\ O_2 + NADPH \longrightarrow 2\ O_2^- + NADP^+ + H^+$	NADPH-Oxidase
$2\ O_2^- + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	Superoxiddismutase
$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$	Haber-Weiss-Reaktion
$Cl^- + H_2O_2 \longrightarrow HOCl + H_2O$	Myeloperoxidase

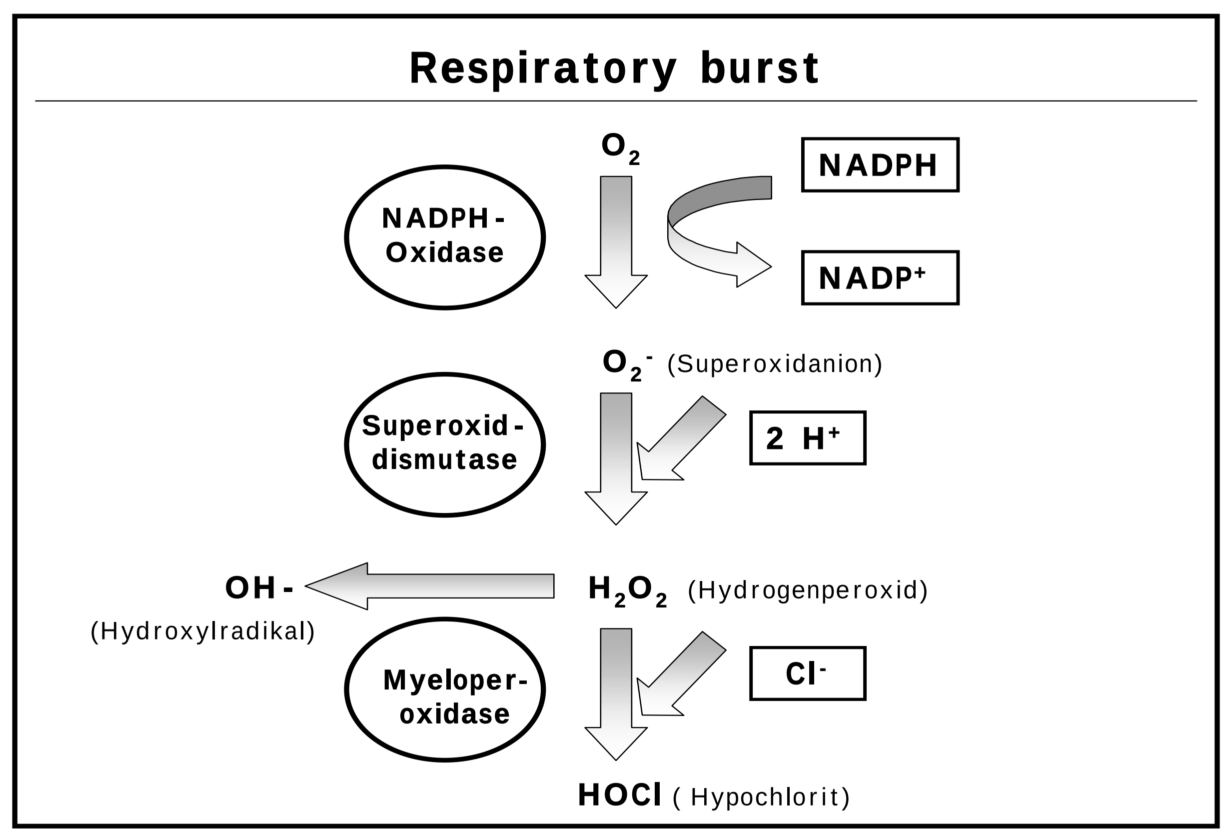


Abbildung 1: Chemische Abläufe des Respiratory Burst

Das Schlüsselenzym für den Respiratory Burst ist die NADPH-Oxidase, die in der Plasmamembran angesiedelt ist. Sie reduziert O_2 zu O_2^-, wobei NADPH zu $NADP^+$ oxidiert wird. Durch $NADP^+$ wird der Hexose-Monophosphat-Weg aktiviert, der $NADP^+$ wieder in NADPH verwandelt. Dieser Prozess verbraucht Glucose und damit Energie.

Das O_2^- wird nun mit Protonen zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Wasser reduziert, entweder spontan oder katalysiert durch das Enzym Superoxiddismutase. Damit ist der eigentliche, sauerstoffverbrauchende Vorgang des Respiratory Burst abgeschlossen. Superoxidanion und Hydrogenperoxid sind potente Sauerstoffradikale. Durch Sekundärreaktionen entstehen noch weitere reaktive Sauerstoffmetaboliten wie $OH^{\cdot}$ und OH^- (BABIOR 1984). Mehrere oder alle der entstehenden freien Sauerstoffradikalen sind an der Lichtbildung in der Chemilumineszenzreaktion (CLReaktion) beteiligt (CHESON et al. 1976).

Mit Halogenionen wie Cl^-, J^- oder Br^- und katalysiert durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO) bildet H_2O_2 Halogensäuren, die ebenfalls bakterizid wirken.

Diese freien Sauerstoffmetaboliten und die Halogensäuren wirken einerseits in den Phagosomen der Zelle und töten phagozytierte Bakterien ab. Sie werden aber auch nach außen freigesetzt und greifen alles an, was sich in der Umgebung befindet: Bakterien oder absterbende Zellen. Da sie sehr aggressiv sind, werden die umliegenden Zellen teilweise auch abgetötet (BABIOR 1984; ROSSI 1986). Die PMN selbst haben einige Enzyme zum Schutz vor ihren eigenen Sauerstoffmetaboliten. Superoxiddismutase, Katalase und das Glutathionperoxidase-Glutathionreduktase-System bauen H_2O_2 wieder zu Wasser und Sauerstoff ab.

2.3.2.1 NADPH-Oxidase

Dieses Enzym findet sich in der Plasmamembran der PMN und wird nur an der Stelle der Membran aktiviert, die mit dem auslösenden Agens Kontakt hat (ROSSI 1986). Seine Aktivierung ist reversibel. Es katalysiert folgende chemische Reaktion:

$$2\ O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ O_2^- + NADP^+ + 2\ H^+$$

Die NADPH-Oxidase wird im Falle von bspw. opsonisierten Partikeln oder Immunkomplexen über Rezeptorbindung und die direkte Interaktion von Molekülen und Substraten aktiviert (ROSSI 1986). Dadurch wird eine Kette von biochemischen Reaktionen ausgelöst, die letztendlich zur Phosphorylierung von Proteinen und zur Akti-

vierung der NADPH-Oxidase führt. Sie ist von kurzer Dauer und kann ausschließlich durch die fortbestehende Bindung an das Stimulans aufrechterhalten werden.

2.3.2.2 Superoxid-Dismutase (SOD)

SOD katalysiert die Reaktion des Superoxidanions zu Hydrogenperoxid und Sauerstoff. Da das Superoxidanion sehr toxisch für Zellen ist, ist diese Reaktion Bestandteil des Schutzmechanismus der Zellen vor Schäden durch reaktive Sauerstoffmetaboliten (HUU et al. 1984). Dennoch ist Hydrogenperoxid selbst ein freies Sauerstoffradikal, das jedoch von den Zellen durch Katalasen weiter abgebaut werden kann (ROSSI 1986).

Das Superoxidanion wird während der Chemilumineszenzmessung durch Luminol oxidiert. Die Zugabe von SOD hemmt daher die Lichtbildung durch Luminol (PUGET u. MICHELSON 1974; BENSINGER u. JOHNSON 1981).

2.3.2.3 Myeloperoxidase (MPO)

MPO ist ein lysosomales Protein in den primären Granula der PMN und eine wichtige Komponente der sauerstoffabhängigen antimikrobiellen Aktivität (COORAY et al. 1993). Es lässt sich als Entzündungsenzym diagnostisch nutzen (COORAY 1994).

Reife Makrophagen bilden zwar Superoxidanionen, haben aber keine MPO. Daher ist die Messung der Chemilumineszenz aus Makrophagen nicht möglich (HOLMBERG u. CONCHA 1985). MPO findet sich nicht in eosinophilen Granulozyten oder in reifen Makrophagen, aber in den Lysosomen juveniler Monozyten und Makrophagen (BABIOR 1984; HALLÉN SANDGREN et al. 1991).

Eine Methode zur Bestimmung der MPO-Aktivität findet sich unter ROTH und KAEBERLE (1981). KIMURA et al. (1999) und KIMURA et al. (2002) verweisen in ihren Veröffentlichungen auf diese Quelle.

Die CL-Messung aus Zellen von Menschen mit MPO-Defizienz ergab keine messbaren Werte, wohl aber die Bestimmung der O_2^--Produktion. Letztere wurde im Photospektrometer über die Reduktion von Cytochrom c erfasst (DAHLGREN u. STEN-

DAHL 1983). Die Zugabe von MPO zu den Zellen der Patienten bewirkte eine Antwort in der CL-Messung.

2.4 Labordiagnostische Methoden

2.4.1 Labordiagnostik aus Blutproben

Vollblutuntersuchungen liefern Informationen über den allgemeinen Gesundheitszustand des Tieres. Mastitiden können systemische Auswirkungen haben, aber auch andere systemische Erkrankungen können die Eutergesundheit beeinträchtigen.

Zu den Untersuchungen zählen im Wesentlichen das rote Blutbild mit Erythrozytenzahl und Hämatokrit, die Leukozytenzahl und das Differentialzellbild (KRAFT u. DÜRR 1997).

Die Bestimmung des weißen Blutbildes gibt Informationen über den Immunstatus des Tieres. Ist die absolute Zahl der Leukozyten unterhalb des Referenzbereiches, so ist dies ein Zeichen für virale Infektionskrankheiten, Zellgifte oder einen erhöhten Leukozytenverbrauch im Rahmen von perakuten Entzündungen. Die Leukozytose ist häufig eine Antwort des Immunsystems auf Infektionskrankheiten (BICKHARDT 1992). Sie kann auch Ausdruck einer Vergiftung, einer endokrinen Schwankung (Gabe von Kortikosteroiden) oder einer Leukose sein.

Die Auswertung des Differentialzellbildes gibt weiteren Aufschluss über die Art der Störung. Unterschieden wird zwischen reifen (segmentkernigen) und unreifen (stabkernigen) PMN, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (BICKHARDT 1992). Eine genauere Unterteilung der Zellarten, insbesondere ihrer Vorläufer, die nur selten im Blut zu finden sind, ist möglich. Außer für besondere Fragestellungen werden diese letztgenannten Zellarten während der Differenzierung jedoch nicht berücksichtigt.

Die Neutrophilie geht häufig mit der Leukozytose einher und hat als häufigste Ursache Infektionskrankheiten, vornehmlich bakterieller Art. Die Neutropenie dagegen ist oft Zeichen einer viralen Infektion. Chronische Infektionskrankheiten zeichnen sich

durch eine Lymphozytose aus (KRAFT u. DÜRR 1997). Erhöhte Zahlen der eosinophilen Granulozyten in Rinderblutproben sprechen für Parasitosen (BICKHARDT 1992).

2.4.2 Methoden zur Zellisolation aus Blut und Milch

2.4.2.1 Isolierung von PMN aus Vollblut

CARLSON und KANEKO haben im Jahre 1973 ein Verfahren zur Isolation von PMN aus Blut beschrieben, das von vielen Autoren zitiert wird (PAAPE et al. 1975; WEBER at al. 1983; SILVA et al. 1989; SALGAR et al. 1991; SMITS et al. 2000; MEHRZAD et al. 2001a, 2002; MEHRZAD 2002). Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise ist in Tabelle 5 dargestellt.

Der Einsatz von Percoll® ermöglicht die Herstellung reiner PMN-Suspensionen (MOTTOLA et al. 1980). Nach der Zentrifugation und hypotonen Lyse der Erythrozyten nach dem Verfahren von CARLSON und KANEKO (1973) folgt ein weiterer Arbeitsschritt, in dem mittels Percoll® eine hochreine PMN-Fraktion ohne eosinophile Granulozyten gewonnen werden kann.

Obwohl ROTH und KAEBERLE (1981) selbst die Methode von CARLSON und KANEKO (1973) als Quelle angaben, modifizierten sie die Vorgehensweise der Zellisolation aus Blut derartig, dass viele Autoren dieses Verfahren später zitierten, z. B. ROTH et al. 1983, KEHRLI U. GOFF 1989, KEHRLI et al. 1989, SHUSTER et al. 1996, DOSOGNE et al. 1999 und KIMURA et al. 2002. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Isolation von Blut-PMN in Anlehnung an ROTH und KAEBERLE (1981) durchgeführt.

HALLÉN SANDGREN und BJÖRK stellten 1988 ein Verfahren vor, in dem Metrizamid als Dichtegradient benutzt wird. Einige Untersucher beziehen sich in ihren Quellenangaben auf diesen Artikel (z. B. PERSSON et al. 1993). Drei Jahre später gelang es ihnen, diese Technik auch auf die Isolation von Zellen aus der Milch zu übertragen (HALLÉN SANDGREN et al. 1991).

Weitere Verfahren zur Isolation von PMN aus Blut werden in Tabelle 5 vorgestellt.

Tabelle 5: Methoden zur Isolation von PMN aus Vollblutproben		
Autor	Vorgehen	zitiert von:
Carlson u. Kaneko 1973	• 40 ml EDTA-Blut aufgeteilt in 4 mal 10 ml Zentrifugation 10 Minuten bei 1000xg Entfernen von Plasma und oberem Teil der Erythrozyten • Hypotone Lyse: Zugabe von 20 ml deionisiertem Wasser Nach 30 Sekunden Zugabe von 10 ml phosphatgepufferter 2,7%iger NaCl-Lösung Zentrifugation 10 Minuten bei 200xg • Aspiration und Verwerfen des Überstandes Resuspendierung in 5 ml PBS Zweimaliges Waschen in 35 ml PBS und Zentrifugation 8 Minuten bei 200xg • Resuspendierung in 5 ml PBS	Paape et al. 1975 Weber at al. 1983 Silva et al. 1989 Salgar et al. 1991 Smits et al. 2000 Mehrzad et al. 2001a Mehrzad et al. 2002
Mottola et al. 1980	• Zentrifugation und hypotone Lyse s. Carlson u. Kaneko 1973 • Percoll® mit einer Dichte von 1,10 g/ml • Zentrifugation von 34 ml Percoll® 30 Minuten bei 35000xg • Überschichtung des Percoll® mit 2 – 3 x 10^8 Granulozyten Zentrifugation 10 Minuten bei 7500xg • Absaugen der beiden zellhaltigen Schichten Dreimaliges Waschen in Krebs Ringer Phosphatlösung bei 100xg • Resuspendierung in Krebs Ringer Phosphatlösung	Heyneman et al. 1990 Dosogne et al. 1997

Tabelle 5: Methoden zur Isolation von PMN aus Vollblutproben		
Autor	Vorgehen	zitiert von:
Roth u. Kaeberle 1981	• Zentrifugation der Zitrat-Blutprobe 20 Minuten bei 1000xg Abnahme von Plasma und Buffy Coat • Hyoptone Lyse: Zugabe von 2 Teilen phosphatgepuffertem deionisiertem Wasser Nach 45 Sekunden Zugabe von einem Teil phosphatgepufferter 2,7%iger NaCl-Lösung Zentrifugation • Zweifaches Waschen in HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} Endkonzentration: 5,0 x 10^7 PMN / ml	Roth et al. 1983 Kehrli u. Goff 1989 Kehrli et al. 1989 Shuster et al. 1996 Dosogne et al. 1999 Kimura et al. 2002
Saad u. Hageltorn 1985	• 10 ml heparinisiertes Blut • Dichtegradienten mit Percoll®: 10 ml mit Dichte 1,103 g/ml; 20 ml mit Dichte 1,087 g/ml • Überschichtung des Dichtegradienten mit 9 ml Blut (1:1 verdünnt mit PBS) Zentrifugation bei 1800xg, 15´ • Abnahme von Plasma, Buffy Coat und 1 cm Percoll® • Absaugen der Fraktion zwischen den beiden Gradienten (enthält PMN) mit Pasteurpipette • Lyse der Erythrozyten mit dest. Wasser, 45 Sekunden • Zweimaliges Waschen der PMN in HBSS mit 2 % BSA Endkonzentration: 5 x 10^6 PMN/ml in HBSS mit 2 % BSA	

Tabelle 5: Methoden zur Isolation von PMN aus Vollblutproben		
Autor	Vorgehen	zitiert von:
Hed et al. 1987	• 0,1 ml humanes EDTA-Blut • Lyse der Erythrozyten mit 2 ml NH_4Cl ‚Lysing reagent' Zentrifugation bei 300xg für 5 Minuten • Waschen des Pellets in Gey´s Medium	
Hallén Sandgren u. Björk 1988	• 20 ml Zitratblut • Herstellung verschiedener Dichtegradienten mit Metrizamid in Tyrode´s gel solution • Zentrifugation 15 Minuten bei 1000xg ohne Bremse • Hypotone Lyse • Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung • Überschichtung des Metrizamidgradienten Zentrifugation 45 Minuten bei 1200xg • Aspiration der Zellen jeder der Phasen, Auffüllen der Probe mit 0,9% NaCl auf 10 ml Gesamtvolumen Zentrifugation 5 Minuten bei 200xg • Hypotone Lyse verbliebener Erythrozyten • Zentrifugation 5 Minuten bei 200xg • Resuspendierung der Pellets in 0,5 ml GBSS	Hallén Sandgren et al. 1991 Persson et al. 1993

Tabelle 5: Methoden zur Isolation von PMN aus Vollblutproben		
Autor	Vorgehen	zitiert von:
Cooray 1996	• Verdünnung von heparinisiertem Vollblut 1:2 mit PBS • Überschichtung des Ficoll-Paque® Zentrifugation 45 Minuten bei 700xg Gewinnung der PMN mit Erythrozyten • Hypotone Lyse: Zugabe von deionisiertem Wasser Nach 30 Sekunden Zugabe von 3,6%igem NaCl • Zweifaches Waschen in PBS mit Zentrifugation für 10 Minuten bei 400xg • Resuspendierung in PBS mit Ca2+ und Mg2+	

2.4.2.2 Isolierung somatischer Zellen aus Milch

Für die Gewinnung der Zellen aus Milchproben gibt es bis jetzt kein Standardverfahren. Dennoch führen viele Autoren die Milchzellisolation auf ähnliche Weise durch. Einige Untersucher orientierten sich dabei an der von CARLSON und KANEKO (1973) etablierten Technik zur Zellisolation aus Blut und entfernten den Schritt der hypotonen Lyse von Erythrozyten aus dem Arbeitsprotokoll (PAAPE et al. 1975, WEBER et al. 1983, SALGAR et al. 1991, s. Tabelle 6).

PAAPE et al. veröffentlichten 1977 eine genaue Beschreibung ihrer Methode, die noch 20 Jahre später nachgearbeitet wurde (DULIN et al. 1984, PAAPE et al. 1990b, VANGROENWEGHE et al. 2001).

Auch das von SAAD 1987 vorgestellte Verfahren wird von anderen Autoren zitiert (z. B. ZECCONI et al. 1994).

Weitere Quellenangaben zu diesem Thema sind in Tabelle 6 niedergelegt. Die Verfahren unterscheiden sich im Wesentlichen durch die benötigte Milchmenge, die

g-Zahl während der Zentrifugationsschritte und das verwendete Medium. Milchproben mit variierenden Zellgehalten sowie der Verwendungszweck der gewonnenen Zellen bedingen unterschiedliche Isolationsverfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach PAAPE et al. (1990a) modifiziert angewandt.

Tabelle 6: Methoden zur Isolation von somatischen Zellen aus Milchproben

Autor	Vorgehen	zitiert von:
Paape et al. 1977	• 150 ml Milch • Filtration durch Seide • Zentrifugation 30 Minuten bei 1200xg Entfernen des Überstands • Aufnahme des Pellets in 40 ml PBS und zweimaliges Waschen Zentrifugation 15 Minuten bei 200xg • Endkonzentration: 25 oder 100 x 10^6 PMN/ml	Dulin et al. 1984 Paape et al. 1990b Vangroenweghe et al. 2001
Weber et al. 1983	• 40 ml Milch • Zentrifugation 20 Minuten bei 1000xg Entfernen der Fettschicht Dekantieren des Überstandes • Zweifaches Waschen in Eagle´s Medium mit Zentrifugation 10 Minuten bei 200xg	
Dulin et al. 1988	• 250 ml Milch • Filtration durch Seide • Zentrifugation 15 Minuten bei 1000xg Entfernen des Fetts und der Magermilch • Auffangen und Waschen des Sediments in 80 ml PBS Zentrifugation bei 200xg • Hypotone Lyse • Waschen mit PBS • Endkonzentration 2,5 x 10^7 Zellen/ml	Mehrzad et al. 2001a

Tabelle 6: Methoden zur Isolation von somatischen Zellen aus Milchproben		
Autor	Vorgehen	zitiert von:
Saad 1987	• Verdünnung von 20 – 25 ml Milch mit PBS auf 100 ml • Filtration durch Nylonnetz • Zentrifugation 15 Minuten bei 1500xg Entfernen der Fettschicht Dekantieren des Überstandes • Auffangen des Pellets in 7 ml PBS • Bei Bedarf Lyse mit 2 Teilen destilliertem Wasser 45 Sekunden Zugabe von 1 Teil phophatgepufferter 2,7%iger Salzlösung • Zweifaches Waschen in HBSS mit 0,05 % humanem Serumalbumin Zentrifugation bei 200xg	Zecconi et al. 1994
Fox u. McDonald 1988	• 50 ml Nachgemelk • Zentrifugation 30 Minuten bei 300xg Entfernen des Fetts Dekantieren des Überstandes • Waschen des Zellpellets in PBS Zentrifugation 15 Minuten bei 350xg • Endkonzentration: 6,25 x 10^6 Zellen/ml	
Paape et al. 1990a	• 250 ml Milch • Filtration durch Seide • Zentrifugation 15 Minuten bei 1000xg Entfernen des Fetts Dekantieren des Überstandes • Zweimalige Resuspension des Pellets in 80 ml PBS Zentrifugation bei 200xg • Endkonzentration: 25 x 10^6 Zellen / ml PBS	

Tabelle 6: Methoden zur Isolation von somatischen Zellen aus Milchproben		
Autor	Vorgehen	zitiert von:
Daley et al. 1991	• 250 ml Milch • Filtration • Zentrifugation 30 Minuten bei 1200xg Entfernen des Fetts Dekantieren des Überstandes • Zweimaliges Waschen des Zellpellets in 50 ml PBS • Endkonzentration: 10^6 Zellen / ml in RPMI Medium mit 5 % fetalem Kälberserum	
Salgar et al. 1991	• 100 ml Milch • Zentrifugation 5 Minuten bei 1500xg Entfernen des Fetts Dekantieren des Überstandes • zweifaches Waschen in PBS Zentrifugation 2 Minuten bei 500xg • Endkonzentration: 1 x 10^7 / ml	
Mehrzad et al. 2001b	• 2 l Milch Verdünnung mit PBS • Zentrifugation 15 Minuten bei 600xg Entfernen des Fetts Dekantieren des Überstandes • Resuspension in PBS Zentrifugation 10 Minuten bei 300xg • Resuspension in PBS Zentrifugation 15 Minuten bei 200xg • Resuspension in DPBS mit 0,5 mg/ml Gelatine Endkonzentration: 5 x 10^6 / ml	Mehrzad et al. 2002

2.4.3 Labordiagnostische Methoden zur Messung der Phagozytoseaktivität von PMN

Zur in vitro Messung der Phagozytoseaktivität wurden mehrere Methoden evaluiert. Es besteht die Möglichkeit, Bakterien radioaktiv zu markieren und nach Inkubation dieser Bakterien mit PMN die Radioaktivität der Zellen zu messen (s. Abschnitt 2.4.3.1). In einem anderen Verfahren wird die Zahl der phagozytierten Bakterien nach Kultivierung mikroskopisch bestimmt (s. Abschnitt 2.4.3.2). Sind die Bakterien mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, so können die aktiven und die nicht aktiven Zellen anhand dieses Farbstoffes im Durchflusszytometer voneinander unterschieden werden (s. Abschnitt 2.4.3.3). Alle Verfahren zur Diagnostik der Zellfunktionalität lassen sich nur an isolierten Zellen und nicht im Ausgangsmedium durchführen.

2.4.3.1 Szintillationsspektrometrie

PAAPE et al. (1975) beschreiben eine Technik zur Messung der Phagozytoseaktivität von PMN aus Blut und aus Milch. Dafür benutzten sie *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, die mit radioaktivem ^{32}P markiert waren. Zur Opsonisierung wurden sie noch mit Serum, Vollmilch, Magermilch, Molke oder PBS inkubiert. PMN aus Blut bzw. Milch wurden zugegeben und inkubiert. Die nicht phagozytierten Bakterien wurden durch die Zugabe von Lysostaphin in einer weiteren Inkubation zerstört. Durch Zentrifugation wurden nun die PMN mit den phagozytierten *S. aureus* entfernt, und die Radioaktivität im Überstand im Szintillationsspektrometer gemessen (s. Tabelle 7).

Mit Hilfe eines Standards, der statt Zellen nur PBS enthielt, und eines Blindwertes (ohne Bakterien) zur Bestimmung der Hintergrundradioaktivität, konnte nun der Prozentsatz phagozytierter Bakterien errechnet werden.

PMN aus Blut phagozytierten 80 % (Serum), 44 % (Vollmilch), 74 % (Magermilch), 72 % (Molke) bzw. 11 % (PBS) der Bakterien. Die PMN aus der Milch phagozytierten

entsprechend 78 %, 44 %, 72 %, 74 % bzw. 22 % der *S. aureus* (PAAPE et al. 1975). Die unterschiedlichen Ergebnisse liegen im Fettanteil der Medien begründet.

Auf diese Methode wird in den folgenden Jahren häufig in der Literatur hingewiesen (PAAPE et al. 1977; DULIN et al. 1984, 1988, 1990a; PAAPE u. MILLER 1988; KLUCIŃSKI et al. 1988) (s. Tabelle 7).

2.4.3.2 Kultivierung

Im Rahmen einer Untersuchung über den Zusammenhang zwischen Phagozytose und intrazellulärem Abtöten von *S. aureus* in PMN aus Blut wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau angewandt (WILLIAMS et al. 1985). Nach der Inkubation mit Lysostaphin wurde jedoch Trypsin zugegeben. Dadurch wurde die Wirkung des Lysostaphin neutralisiert, sodass die intrazellulär überlebenden *S. aureus* geschont wurden. Durch Ausstrich auf einer Blutagarplatte (BAP) konnte dann die Zahl der überlebenden Bakterien bestimmt werden. Die Zahl der aktiven Phagozyten und der aufgenommenen Bakterien wurden mikroskopisch ermittelt.

Diese Technik machten sich auch FOX und MCDONALD (1988) für ihre Untersuchung von Milch aus mit *S. aureus* infizierten Eutervierteln zunutze (s. Tabelle 7).

Ebenfalls im Ausstrichverfahren auf Blutagarplatten bestimmten SORDILLO und BABIUK (1991) die Phagozytoseaktivität von aus Milch isolierten PMN.

2.4.3.3 Durchflusszytometrie

Aus bovinen Blut-PMN lässt sich die Phagozytoseaktivität auch im Durchflusszytometer bestimmen (SAAD u. HAGELTORN 1985). Die Isolation der PMN aus dem Blut erfolgt in diesem Versuch unter Einsatz eines diskontinuierlichen Dichtegradienten (s. Tabelle 5). Die gewonnenen PMN phagozytieren Bakterien (*S. aureus*) oder Zymosanpartikel, die mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt sind (s. Tabelle 7). Die Probe wird inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer ausgewertet. Damit werden die Zahl der freien Bakterien und der Anteil aktiver Zellen anhand der Fluoreszenz der in den PMN befindlichen Bakte-

rien bestimmt. Benutzt wurde in dieser Untersuchung ein Zytofluorograf 50L mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (SAAD u. HAGELTORN 1985).

Für die Messung der Phagozytoseaktivität von PMN aus Milch wurden 25 ml Milch eingesetzt (SAAD 1987). Die Messung und Auswertung am Durchflusszytometer erfolgte nach dem von SAAD und HAGELTORN (1985) beschriebenen Verfahren (s. Tabelle 7).

Diese Technik wird von zahlreichen Autoren zitiert. So wurden Korrelationen zwischen der Schwere der Infektion und der Gesamtzahl phagozytierender PMN und reifer PMN im Blut direkt vor einer Infektion mit *E. coli* festgestellt (DOSOGNE et al. 1997).

Die Phagozytoseaktivität von humanen Granulozyten kann auch in Vollblutproben gemessen werden (HED et al. 1987). Anstelle von Bakterien wurden mit FITC gekoppelte Hefe-Partikel, die mit C3b opsonisiert waren, verwendet. Außerdem wurde mit Trypanblau zwischen angelagerten und aufgenommenen Partikeln unterschieden. Dies wurde von einigen Autoren übernommen (DOSOGNE et al. 1997; VAN WERVEN et al. 1997).

SMITS et al. (1999) setzten bei ähnlichem Vorgehen Propidiumjodid als fluoreszierenden Farbstoff ein und verwendeten für die Messung von aus Blut isolierten PMN ein FACScan-Durchflusszytometer.

Aus zwei Blutproben desselben Rindes von einem Tag konnten keine Unterschiede in der Phagozytoseaktivität festgestellt werden, ebenso wenig aus Doppelansätzen der gleichen Proben (PAAPE u. MILLER 1988). Die Variation von Woche zu Woche von 36,4 % wurde auf die Isolationstechnik zurückgeführt.

Tabelle 7: Verschiedene Techniken zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität von PMN im Vergleich			
Quelle	Paape et al. 1975	Dulin et al. 1984	Williams et al. 1985
Bakterien	0,5 ml ^{32}P-gekoppelte *S. aureus* (2 x 10^8/ml)	0,5 ml ^{32}P-gekoppelte *S. aureus* (4 x 10^8/ml)	0,1 ml *S. aureus* (6 x 10^6/ml)
Zellen	1 ml Zellsuspension (2,5 x 10^7/ml)	0,5 ml Zellsuspension (2,5 x 10^7/ml)	0,2 ml PMN (10^7/ml)
Inkubation	30 Minuten bei 37°C 2 ml Serum, Vollmilch, Magermilch, Molke oder PBS	60 Minuten bei 37°C 1 ml Magermilch, Molke, Kolostrum, Serum oder anderes	1,5 h bei 37°C mit 1 % Serum, Ausstrich 1 auf BAP
weitere Schritte	Lyse der nicht phagozytierten *S. aureus* durch Zugabe von 5 ml Lysostaphin (10 U), Inkubation 30 Minuten, 37°C, Zentrifugation und Messen des Überstands		Zentrifugation, vom Überstand Ausstrich 2 auf BAP, 0,6 ml Lysostaphin, Inkubation 20´, 0,05 ml Trypsin, Inkubation 10´, Ausstrich 3 auf BAP
Auswertung	Szintillationsspektrometer: erfasst die Radioaktivität von ^{32}P Standard: keine Zellen Blindwert: keine Bakterien Ergebnis: Prozentsatz phagozytierter Bakterien		Ausstrich 1: Erhebung der gesamten bakteriziden Aktivität, Ausstrich 2: extrazelluläre Bakterien, Ausstrich 3: intrazellulär überlebende Bakterien
zitiert von:	Paape et al. 1977 Paape u. Wergin 1977 Paape et al. 1978 Guidry et al. 1980 Kluciński et al. 1988 Paape u. Miller 1988 Paape et al. 1990a	Dulin et al. 1988 Miller et al. 1988	

Tabelle 7: Verschiedene Techniken zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität von PMN im Vergleich

Quelle	Saad u. Hageltorn 1985	Fox u. McDonald 1988	Sordillo u. Babiuk 1991
Bakterien	0,1 ml FITC-gekoppelte *S. aureus* (5×10^8/ml)	0,1 ml *S. aureus* (20×10^6 cfu/ml)	1 ml opsonisierte *S. aureus* (1×10^6 cfu/ml)
Zellen	0,5 ml Zellsuspension (5×10^6 PMN/ml)	5×10^6 PMN/ml	1 ml Zellsuspension (1×10^6/ml)
Inkubation	15 Minuten bei 37°C mit 0,4 ml verdünntem Serum, gesamt: 20 Bakterien:1 PMN, 10 % Serum	30 Minuten bei 37°C mit 0,1 ml Serum	10 Minuten bei 37°C
weitere Schritte	Zugabe von 6 ml 0,9 % NaCl mit 0,02 % EDTA zum Beenden der Phagozytose, Zugabe von Akridinorange	siehe Paape et al. 1975, Zugabe von 1 ml 0,05 % Trypsin zum Neutralisieren des Lysostaphin, Inkubation 60 Minuten	Zentrifugation, Resuspension in HBSS mit 0,1 mg Lysostaphin, Inkubation 30 Minuten, Zentrifugation, Resuspension in 1 ml HBSS
Auswertung	Zytofluorograf 50L mit 100 mW Argon-Ionenlaser, 488 nm, Fluoreszenz bei 600 – 650 nm bzw. 515 – 575 nm gemessen, Anteil phagozytierender PMN anhand Zahl fluoreszierender Zellen, Bakterien pro PMN anhand MFI bestimmt	vor Trypsinzugabe: Ausstrich und mikroskopische Bestimmung aktiver Zellen und Zahl der phagozytierten Bakterien; nach Trypsinzugabe: Ausstrich auf Blutagarplatte zur Bestimmung der Zahl der cfu	Ausstrich und Koloniezählung auf Blutagarplatte
zitiert von:	Saad 1987, Daley et al. 1991, Dosogne et al. 1997, van Werven et al. 1997		

2.4.4 Labordiagnostische Methoden zur Messung der freien Sauerstoffradikale

Für die Messung der freien Sauerstoffradikale gibt es mehrere Verfahren. Entweder werden die gebildeten reaktiven Gruppen (H_2O_2, O_2^- und OH^-) über bestimmte chemische Reaktionen in Licht umgewandelt, welches im Luminometer erfasst wird (s. Abschnitt 2.4.4.3). Diese Methode wird Chemilumineszenz genannt. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, die Bildung dieser Oxidantien (reactive oxygen species = ROS) mithilfe eines zu oxidierenden, fluoreszierenden Farbstoffes im Durchflusszytometer zu ermitteln (s. Abschnitt 2.4.4.2). In Abschnitt 2.4.4.1 ist der Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionstest beschrieben, mit dem die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten ebenfalls bestimmt werden kann.

2.4.4.1 Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionstest

Dieser Test beruht auf dem Prinzip der Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium zu Formazan, wobei der Farbumschlag im Spektrophotometer bestimmt wird. Mehrere Autoren haben Methoden zur Bestimmung der Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion vorgestellt. Beispielhaft ist hier diejenige von ROTH und KAEBERLE (1981) beschrieben. Für die Reaktion wird Nitroblau-Tetrazolium zu PMN und Zymosan gegeben und fünf Minuten inkubiert. Anschließend wird die optische Dichte bei 580 nm im Spektrophotometer bestimmt.

Die Verbindung zwischen erhöhten Östradiol- und Progesterongehalten im Blut und veränderten Zellfunktionen wurde mit dieser Technik untersucht (ROTH et al. 1983).

Messbare Ergebnisse finden sich im Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionstest nur in segmentkernigen PMN aus Blut und Knochenmark und in eosinophilen Granulozyten aus Blut (SILVA et al. 1989). Milchzellen wurden nicht untersucht.

2.4.4.2 ROS-Bildung

Eine modernes Verfahren zur Messung der Respiratory-Burst-Aktivität ist die Bestimmung der ROS-Bildung im Durchflusszytometer. Hierbei wird Dichloro-Fluorescin-Diacetat (DCFH-DA) zum Einsatz gebracht. Dieser Stoff kann durch die Zytoplasmamembran in die Zelle wandern, wo es durch Plasmaesterasen zu Dichloro-Fluorescin (DCFH) deacetyliert wird. DCFH ist nun nicht mehr in der Lage, die Zelle wieder zu verlassen. Wird die Zelle zur Bildung von Sauerstoffmetaboliten angeregt, z. B. durch PMA, so oxidiert das Hydrogenperoxid DCFH zu nativem fluoreszierendem Dichlorofluorescin (DCF). Die entstehende Fluoreszenz ist zellgebunden und kann im Durchflusszytometer erfasst werden (BASS et al. 1983).

Die optimale PMA-Konzentration beträgt für diesen Versuchsaufbau 10 ng / ml (SALGAR et al. 1991). Als Hauptquelle für Variationen gelten technische Schwankungen während der Isolation der PMN.

2.4.4.3 Chemilumineszenz (CL) und labordiagnostische Methoden

Diese Methode wurde in der Humanmedizin entwickelt (ALLEN et al. 1972). Heute wird die CL-Aktivität auch in PMN aus Blut und Milch von Rindern untersucht.

Das Prinzip der CL-Messung beruht darauf, dass PMN durch Zugabe eines Aktivators angeregt werden, freie Sauerstoffradikale zu produzieren. Die Oxidantien werden dann durch eine weitere Chemikalie in Licht umgewandelt, welches im Luminometer erfasst werden kann. Die Lichtemission wird über einen längeren Zeitraum in mehreren Einzelmessungen erfasst. Aus den Einzelwerten wird dann das Maximum, aber auch das Integral der entstehenden Kurve als Ergebnis berechnet.

2.4.4.3.1 Reagenzien

2.4.4.3.1.1 Lumineszierende Stoffe

Für die Messung der CL-Aktivität wird ein Reagenz benötigt, das die Sauerstoffradikalen in Licht umsetzt. Dafür ist der Einsatz von zwei Stoffen üblich: Lucigenin und

Luminol sind die am besten untersuchten lichtbildenden Chemikalien. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) ist eine Substanz, die Licht emittiert, während sie oxidiert wird (BROLIN u. WETTERMARK 1992).

BENSINGER und JOHNSON stellten 1981 fest, dass bei Anwesenheit von SOD keine luminolabhängige CL-Aktivität mehr messbar ist. Sie schlossen daraus, dass Luminol von Superoxid oxidiert wird. Im Gegensatz dazu kamen DECHATELET et al. (1982) zu dem Schluss, dass nur die CL-Messung ohne Luminol von Superoxid abhängig ist, da nach Zugabe von SOD keine Aktivität gemessen werden kann. Die luminolabhängige CL-Aktivität dagegen ist gegenüber SOD unempfindlich, Luminol infolgedessen vom MPO-System und von Hydrogenperoxid abhängig.

Die Messung der CL-Aktivität mit und ohne Zugabe von Luminol ergibt aus den Proben mit Luminol etwa viermal höhere Werte als aus denen ohne Luminol (WEBER et al. 1983). Andere Autoren beschreiben, dass in bestimmten Proben eine CL-Aktivität überhaupt nur mit Zusatz von Luminol zur Probe gemessen werden kann (ALLEN u. LOOSE 1976).

Die mit Luminol gemessenen Proben haben stets höhere Werte als solche, die mit Lucigenin gemessen werden (HALLÉN SANDGREN et al. 1991).

MEHRZAD (2002) gibt an, dass mit einer Konzentration von 0,1 mmol/l Luminol die maximale CL-Antwort während der Messung von PMN aus Blut und aus Milch erreicht werden kann.

2.4.4.3.1.2 Aktivatoren

Die CL-Aktivität wird in vivo durch eine Vielzahl von Partikeln oder Proteinen zur Bildung von freien Sauerstoffmetaboliten angeregt (s. o.). Ebenso vielfältig sind die Möglichkeiten, diese Reaktion in vitro zu provozieren. Neben der Variante, Bakterien mit oder ohne opsonisierende Stoffe wie z. B. die Komplement-komponente C3b einzusetzen, gibt es auch einige chemische Substanzen.

Unter Verwendung von Bakterien werden diese phagozytiert. Das ist der Grund, weshalb manche Autoren die Messung der CL-Aktivität als Phagozytoseaktivität bezeichnen (ZECCONI et al. 1994).

Chemische Substanzen, die häufig eingesetzt werden, sind fMLP (Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin), Ca^{2+}-Ionophore, Zymosan und PMA. Da sie sich in ihrem Wirkungsmechanismus voneinander unterscheiden, differieren auch die Ergebnisse der CL-Messung.

fMLP ist ein chemotaktisches Peptid, das ebenso wie Zymosan am GTP-bindenden Protein angreift. Ca^{2+}-Ionophore nehmen direkt Einfluss auf den Calcium-Einstrom in die Zellen. PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) dagegen aktiviert die Protein Kinase C (ROSSI 1986) und ist daher Calcium-unabhängig (DECHATELET u. SHIRLEY 1982).

Unter Einsatz von fMLP an humanen PMN aus Blut kam es zu einer CL-Verlaufskurve mit zwei Peaks (DAHLGREN u. STENDAHL 1982, BRIHEIM et al. 1984), mit PMA zeigte sich nur ein Peak. Erklärt wurde dieses Phänomen damit, dass der erste Peak der Messung mit fMLP von extrazellulären Reaktionen herrührte, während PMA nur intrazelluläre Reaktionen hervorrief. Ein Vergleich von Ca-Ionophoren mit PMA (DECHATELET et al. 1982) zeigte, dass Ca-Ionophore höhere CL-Antworten verursachen als PMA.

PMA bringt nur in Anwesenheit von Protein oder Luminol messbare Ergebnisse hervor. DMSO hat keinen Einfluss auf die CL-Messung (WESTRICK et al. 1980).

Nach MEHRZAD (2002) liegt die optimale PMA-Konzentration zwischen 100 und 500 ng/ml für PMN aus Blut und zwischen 100 und 200 ng/ml für PMN aus Milch.

2.4.4.3.2 Geräte

2.4.4.3.2.1 Szintillationsspektrometer

Diese Methode wurde 1972 von ALLEN et al. evaluiert. Zellsuspension, Luminol (z. T. mit BSA) und ein Aktivator werden, häufig nach Inkubation im Dunkeln (WEBER et al. 1983), im Flüssigszintillationsspektrometer gemessen. In diesem Gerät

werden Lichtquanten durch zwei Photomultiplier in Elektronen umgewandelt und gezählt. Die Ausgabe des Messergebnisses erfolgt üblicherweise in Impulsen pro Minute (FALBE u. REGITZ 1992). Das Gerät ist im „Out-of-coincidence“-Modus, um eine höhere Sensitivität zu erzielen (KEHRLI et al. 1989). In diesem Modus genügt es, wenn einer der zwei Photomultiplier einen Impuls empfängt. Manche Autoren schreiben auch, dass der Coincidence-Modus geeignet sei, in dem Impulse von beiden Photomultipliern gleichzeitig detektiert werden müssen, da ihre Proben stärker leuchten (ALLEN u. LOOSE 1976; HOEBEN 1999). Um Blindwerte zu erhalten, werden die Proben zweimal gemessen, bevor der Aktivator hinzugefügt wird. Wahlweise dient ein Probengefäß ohne Zellen als Blindwert (ROTH u. KAEBERLE 1981). Die Proben werden in Intervallen von drei bis 16 Minuten gemessen, die Gesamtdauer der Messung liegt zwischen 20 (DECHATELET u. SHIRLEY 1982) und 170 Minuten (PAAPE et al. 1990b). Wichtig ist, dass die Messung in einem dunklen Raum stattfindet, die Proben und Reagenzien werden meist vor der Messung bereits auf 37° C erwärmt (WEBER et al. 1983).

Folgende Autoren wandten diese Technik für ihre Untersuchungen an: KEHRLI et al. 1989, PAAPE et al. 1990a, 1990b, HOEBEN et al. 1997, DOSOGNE et al. 1999 u. a.

2.4.4.3.2.2 Luminometer

Das Gerät verfügt über einen Photomultiplier, mit dem Licht in einer Wellenlänge von 270 – 670 nm detektiert wird. Während des Messvorganges werden Lichtereignisse erfasst.

EASMON et al. (1980) stellten eine Möglichkeit zu Messung der CL-Aktivität im Luminometer vor. Es sind weniger Zellen in der Probe erforderlich, und die Temperatur kann im Gerät stabil gehalten werden. Außerdem ist die Durchführung einfacher und kostengünstiger als im Szintillationsspektrometer.

Um die Untersuchung durchzuführen, werden ebenfalls die Zellsuspension, Luminol und ein Aktivator gemeinsam in einem Reaktionsgefäß gemessen. Auch hier werden mehrere Einzelmessungen (z. B. in 30-Sekunden-Intervallen, ANGLE u. KLESIUS

1983) über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt. Das Luminometer besitzt eine lichtdichte Kammer, in der die Temperatur regulierbar ist. Der Raum muss daher nicht abgedunkelt werden. Üblicherweise wird die Messung bei 37° C durchgeführt (ANGLE u. KLESIUS 1983; MEHRZAD 2002). Das Ergebnis wird in mV (EASMON et al. 1980; WILLIAMS et al. 1985) oder als Impulsrate (z. B. HOEBEN et al. 2000a; MEHRZAD 2002) angegeben. Es werden das Integral der Einzelwerte (z. B. HOEBEN et al. 2000a; MEHRZAD 2002) oder das erreichte Maximum (WILLIAMS et al. 1985) als Endergebnis verwendet.

Die Autoren LOHUIS et al. 1990, KREMER et al. 1993, HOEBEN et al. 2000a, 2000b und MEHRZAD 2001a, 2002 geben diese Methode in ihren Veröffentlichungen an.

2.4.4.3.3 Einflussfaktoren auf die CL-Messung

Um die tatsächliche Aktivität der PMN zu ermitteln, bedarf es einer bereinigenden Berechnung. Zunächst muss die Vitalität der Zellen in der Zellsuspension ermittelt werden. Abgestorbene Zellen in der Probe sollten nicht in die Berechnung der CL-Aktivität eingehen. Sofern die PMN nicht hochrein vorliegen, muss die CL-Aktivität der vorhandenen sonstigen Zellarten bekannt sein und deren Anteile rechnerisch erfasst werden.

2.4.4.3.3.1 Vitalität

MEHRZAD (2002) beschreibt die Bestimmung der Vitalität von isolierten Zellen im Durchflusszytometer. Vitale Zellen lassen sich mit dem fluoreszierenden Farbstoff Propidiumjodid nicht anfärben. Im Durchflusszytometer kann die Rotfluoreszenz durch den entsprechenden Laser bei 650 nm detektiert werden. Auf diese Weise kann zwischen lebenden (nicht fluoreszierend) und toten Zellen (fluoreszierend) unterschieden werden. SCHRÖDER (2003) wandte diese Methode in ihren Untersuchungen ebenfalls an.

2.4.4.3.3.2 Makrophagen

Makrophagen in der Zellsuspension aus Milch sind auch in der Lage, Sauerstoffradikale zu produzieren. Im Luminometer kann jedoch keine CL-Aktivität in Makrophagen nachgewiesen werden (HALLÉN SANDGREN et al. 1991; MEHRZAD 2002).

2.4.4.3.3.3 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind in der Zellsuspension von Blut stets enthalten, wenn die Isolation ohne Percoll® durchgeführt wird. Sie sind nicht zum Respiratory Burst befähigt, besitzen aber ein starkes Eigenleuchten. Die im Luminometer erfasste Leuchtkraft ist etwa fünf Mal höher als die der angeregten PMN. Deshalb wird der Anteil des Lichtes, der von eosinophilen Granuolzyten stammt, von dem Gesamtergebnis abgezogen (HEYNEMAN et al. 1990; MEHRZAD et al. 2001b, 2002).

Auch in der Zellsuspension von Milch finden sich gelegentlich eosinophile Granulozyten, deren Leuchten auf die beschriebene Weise berücksichtigt werden muss.

2.5 Vergleich der Zellfunktionalität boviner Abwehrzellen aus Blut und Milch

2.5.1 Unterschiede in der Funktionalität zwischen PMN aus Blut und Milch

Die Phagozytoseaktivität und die CL-Aktivität sind in Zellen aus Milch im Vergleich zu denen aus Blutzellen herabgesetzt (DULIN et al. 1988; MEHRZAD et al. 2002). PMN aus Milch sind schwächere Phagozyten als die aus Blut. Sie phagozytieren Fett und Kasein aus der Milch und haben daher eine geringere Kapazität, andere Bestandteile wie Bakterien aufzunehmen (PAAPE et al. 1975, 1979; RUSSELL et al. 1977).

Gründe hierfür liegen darin, dass PMN aus Milch während der Inkubation mit Bakterien aggregieren, da die Fettkügelchen sie aneinander binden (SAAD 1987). Auch

weitere Untersuchungen bestätigten, dass PMN aus der Milch weniger aktiv sind als solche aus dem Blut (DULIN et al. 1988; SMITS et al. 1999).

Nicht nur der Anteil phagozytierter Bakterien in aus Milch isolierten PMN ist signifikant niedriger als in PMN aus Blut, sondern auch die Zahl der PMN, die Phagozytose betreiben (SAAD 1987).

Die Phagozytoseaktivität von Zellen aus Blut und Milch desselben Tieres korreliert (SAAD 1987), während zwischen den Kühen große Unterschiede bestehen (PAAPE et al. 1978).

Zellen aus Milch erreichen in der Chemilumineszenzmessung gewöhnlich nur ca. ein Drittel der Werte der Blutzellen desselben Tieres (WEBER et al. 1983). Ebenso ist das Verhältnis der CL-Aktivität aus Milchzellen der vier Euterviertel zu der aus Blutzellen relativ konstant, während zwischen verschiedenen Tieren erhebliche Schwankungen bestehen (WEBER et al. 1983).

Auch in anderen Untersuchungen wurde eine hohe Schwankung zwischen verschiedenen Tieren (62,4 – 70,8 % Variationskoeffizient), aber Varianzen zwischen Doppelmessungen derselben Proben von nur 0,05 % beobachtet (SALGAR et al. 1991).

2.5.2 Varianzen in der Zellaktivität von PMN aus Milch

Mit aus Milch isolierten Zellen wurden lebende *S. aureus* mit unterschiedlichen Anteilen toter *S. aureus* gemischt (WILLIAMS et al. 1985). Im Phagozytosetest stieg die Rate der phagozytierten, aber noch lebenden Bakterien an, je mehr tote *S. aureus* in der Suspension waren. Dies wurde damit erklärt, dass die PMN mit steigendem Angebot zwar mehr Bakterien aufnehmen, jedoch nicht genügend Kapazität zur Abtötung haben.

Durch die vermehrte Anwesenheit von Opsoninen in entzündeten Eutervierteln wird die Phagozytoseaktivität von PMN deutlich erhöht (JAIN und LASMANIS 1978; GUIDRY et al. 1980 ; PAAPE et al. 1981a). Dies deckt sich mit der Vermutung, dass die unterschiedliche Potenz von Milch zur Unterstützung der Phagozytose mit der

Mastitisprävalenz in Verbindung gebracht werden kann (s. Tabelle 7) (PAAPE et al. 1978).

Zwischen Zellen aus niedrigzelliger Milch und Zellen aus hochzelliger Milch besteht ein Aktivitätsunterschied. Nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* stiegen sowohl die Zellzahl als auch die Phagozytosekapazität der Zellen an, der Anteil aktiver Zellen erhöhte sich von 15 auf 80 % (DALEY et al. 1991).

Nach Infusion einer Salzlösung, die 0,1 % Austernglykogen enthielt, in das Euter liess sich 11 Stunden später Milch gewinnen, deren PMN 68 % der ^{32}P-gekoppelten *S. aureus* phagozytierten (PAAPE et al. 1977).

Der Vergleich der Zellaktivität von Zellsuspensionen aus infizierten Vierteln, nicht infizierten Vierteln der gleichen Kühe und aus Vierteln gesunder Kühe zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Phagozytoseaktivität (FOX und MCDONALD 1988). Untersucht wurden Nachgemelke aus Vierteln, die 14 Stunden vorher mit Austernglykogen infundiert worden waren. Unterschiede in der Durchführung der Versuche sind in Tabelle 7 ersichtlich.

2.5.3 Zellfunktionalität in der Frühlaktation von PMN aus Blut und Milch

Die Chemilumineszenzaktivität von aus Milch isolierten PMN ist in der Frühlaktation signifikant niedriger als in der Mittellaktation (VANGROENWEGHE et al. 2001; MEHRZAD 2002).

Im Rahmen einer Untersuchung des Peripartalzeitraumes wurden neben der Chemilumineszenzaktivität auch andere Parameter der Zellfunktionalität wie Migration und antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) aus zirkulierenden PMN in der Peripartalperiode untersucht (KEHRLI et al. 1989) und eine Aktivitätserhöhung zwei Wochen vor der Geburt beobachtet, der ein dramatischer Abfall der Abwehrkapazität in der Woche post partum folgte. In einer ähnlichen Untersuchung wurde festgestellt, dass die CL-Aktivität in Woche 2 post partum ihr Minimum erreichte, ab Woche 3 post partum wieder anstieg, um 6 Wochen post partum wieder ihre Ursprungswerte zu erreichen (HOEBEN et al. 2000a). Die genannten Untersuchungen

wurden an aus Blut isolierten PMN durchgeführt. In aus Blut und aus Milch isolierten PMN kann in der Peripartalperiode eine minimale CL-Aktivität an Tag 2 post partum in beiden Probenarten beobachtet werden (MEHRZAD et al. 2002).

2.5.4 Einfluss des Stoffwechsels auf die Funktionalität von Zellen aus Blut und Milch

Mit steigender Progesteronkonzentration sinkt die Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium und damit die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROTH et al. 1983).

Der Einfluss von Ketonkörpern auf die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und PMN aus Milch und von PMN aus Blut wurde ebenfalls untersucht (KLUCIŃSKI et al. 1988) und festgestellt, dass Makrophagen stark, PMN weniger stark in ihrer Aktivität eingeschränkt werden. Die Zellfunktionalität von PMN aus Milch wurde durch ß-Hydroxybuttersäure schon in subketotischen Konzentrationen gesenkt. Dieser Umstand mag dazu beitragen, dass Kühe in der Postpartalperiode eine höhere Empfänglichkeit für Mastitiden haben (HOEBEN et al. 1997).

Das Auftreten einer postpartalen Hypokalzämie scheint jedoch die zelluläre Immunitätslage nicht zu beeinflussen (KEHRLI u. GOFF 1989).

2.5.5 Zellfunktionalität von PMN aus Blut und Milch im Zusammenhang mit Mastitiden

Im Rahmen einer Untersuchung über den Zusammenhang zwischen der Zellzahl, der bakteriologischen Untersuchung und der CL-Aktivität an 4.883 Viertelgemelksproben wurde eine starke Korrelation zwischen der Zellzahl und der CL-Aktivität festgestellt (LILIUS u. PESONEN 1990). Die Anwesenheit von minoren Pathogenen verursachte einen 7-fachen Anstieg von SCC und CL-Aktivität, während mit majoren Pathogenen in der Probe die Zellzahl um das 14-fache und die CL-Aktivität um das 25-fache anstiegen.

In einem anderen Versuch wurden 12 Kühe kurz nach der Kalbung mit *E. coli* infiziert (DOSOGNE et al. 1997). Einige Tiere hatten prae infectionem eine hohe Leukozytenzahl im Blut und entwickelten eine schwächere Mastitis als die Tiere mit geringerer Leukozytenzahl. Die Ersteren wurden als moderat (M), die anderen als schwer (S) erkrankt bezeichnet. Die S-Tiere hatten drei Tage lang eine herabgesetzte CL-Antwort von aus Blut isolierten PMN, die M-Tiere nur einen Tag. Die CL-Aktivität vor der Infektion hatte keinen Einfluss auf die Schwere der Mastitis. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch schon KREMER et al. (1993).

Auch im Rahmen einer ausführlichen Untersuchung über *E. coli*-Mastitiden mit Kühen in der Postpartalphase wurden die Tiere in moderat (M) und schwer (S) Erkrankende eingeteilt (VANDEPUTTE-VAN MESSOM et al. 1993). Neben der ROS-Kapazität von PMN aus Blut wurden auch klinische Symptome, Milchmengenverluste und Veränderungen in der Milchkomposition registriert. Eine besonderer Schwerpunkt lag auch hier im Zustand des Immunsystems vor der Infektion.

Allgemeiner wurde beschrieben, dass die Zellfunktionalität vor einer Infektion mit *E. coli* ausschlaggebend für die Schwere der Mastitis war (LOHUIS et al. 1990). Die Autoren testeten dies an aus Blut gewonnenen PMN mittels Migration, Chemotaxis, Phagozytose und Chemilumineszenz.

Eine intramammäre LPS-Injektion nimmt Einfluss auf die CL-Aktivität von aus Blut und aus Milch isolierten PMN (MEHRZAD et al. 2001a). Der Anstieg der CL-Aktivität in PMN aus Milch war so hoch, dass die aus Blut gewonnenen Werte übertroffen wurden. Im Blut kam es zu einem biphasischen Anstieg mit minimalen Werten ca. acht Stunden post infectionem.

2.5.6 Einfluss verschiedener Antibiotika auf die Zellfunktionalität von PMN aus Blut und Milch

Einige Autoren untersuchten den Einfluss von Antibiotika auf immunologische Parameter wie Phagozytose, NTB-Reduktion oder Chemilumineszenz (PAAPE et al. 1990a, 1990b; HOEBEN et al. 1998, 2000a). Im Vergleich von Florfenicol, Chloramphenicol und Thiamphenicol wurde nur für Chloramphenicol eine hemmende Wirkung festgestellt (PAAPE et al. 1990a). In einer weiteren Untersuchung wurde entdeckt, dass Tetrazyklin und Gentamicin die Phagozytoseaktivität hemmten, und Tetrazyklin darüber hinaus auch die CL-Aktivität zum Erliegen brachte (PAAPE et al. 1990b). Beide Untersuchungen wurden an aus Milch isolierten Zellen durchgeführt.

Von den untersuchten Antibiotika Ampicillin, Cloxacillin, Dihydrostreptomycin, Doxycyclin, Lincomycin, Neomycin und Oleandomycin hatte nur Cloxacillin keinen Einfluss auf die Messung der Chemilumineszenz von aus Blut isolierten PMN (HOEBEN et al. 1998). Die Herabsetzung der CL-Aktivität durch Oleandomycin, Neomycin, Lincomycin und Dihydrostreptomycin war jedoch auf eine Hemmung der Lichtproduktion zurückzuführen, etwa durch Interferenzen zwischen Luminol und dem MPO-System. Auch bezüglich Doxycyclin lag der niedrigeren CL-Aktivität nur teilweise eine gesunkene Superoxidbildung zugrunde. Nach HOEBEN et al. (2000a) hat die Behandlung der Tiere mit Enrofloxacin während einer *E. coli*-Mastitis keinen Einfluss auf die CL-Aktivität zirkulierender PMN.

2.5.7 Immunologische Ansatzpunkte zur Prävention von Mastitiden

In einer Studie über hochleistende Kühe wurde festgestellt, dass Tiere mit einer hohen Milchleistung signifikant mehr zirkulierende PMN und mononukleäre Zellen im Blut hatten. Diese PMN wiesen ebenfalls eine höhere Chemilumineszenzaktivität und eine stärkere gerichtete Migration auf (DETILLEUX et al. 1995).

Schon 1964 wurde in einer Untersuchung beobachtet, dass sieben Euterviertel mit einer Zellzahl über 200.000 / ml Milch gegen eine experimentelle Infektion mit *Aerobacter aerogenes* geschützt waren (SCHALM et al. 1964). Ein achtes Viertel, das

nach der Infektion nur 50.000 Zellen / ml Milch aufwies, entwickelte eine akute Mastitis. Dies deckt sich mit der Beobachtung (SCHALM et al. 1966), dass die Etablierung einer künstlichen Infektion mit *Streptococcus agalactiae* im Euter von der Immunantwort abhängig ist. Viertel mit einer höheren Zellzahl (200.000 bis 500.000 Zellen / ml Milch) waren gegen eine erneute Infektion geschützt, während die Viertel mit einer um 12 bis 24 Stunden verzögerten zellulären Reaktion gefährdet waren, eine chronische Mastitis zu entwickeln. Auch im Jahr 2000 wurden niedrige Zellzahlen in der Milch mit einem gesteigerten Risiko für klinische Mastitiden in Verbindung gebracht (SURIYASATHAPORN et al. 2000).

Einige Untersucher suchten deshalb nach Wegen, die Zellzahl in der Milch dauerhaft zu erhöhen, um damit einen Schutz vor Infektionen zu erlangen. Das Setzen eines Reizes erhöht die Zellzahl im Sinne einer Stimulation des Immunsystems. Austerglykogen, das in anderen Bereichen als chemotaktisches Agens dient, wurde in jeweils ein Euterviertel von sechs gesunden Kühen infundiert. Nach elf Stunden konnte ein vierfacher Anstieg der Zellzahl aus diesem Euterviertel festgestellt werden. Die daraus isolierten Zellen waren phagozytotisch hoch aktiv (PAAPE et al. 1977).

In den 80er Jahren führte PAAPE mit seinen Kollegen mehrere Versuche über das Einbringen von kunststoffbeschichteten Spiralen (Intramammary Device = IMD) in das Euterlumen durch. Ein IMD verursacht als Fremdkörper eine chronische Entzündungsreaktion und damit wiederum erhöhte Zellzahlen in der Milch. 1981 wurden Tiere untersucht, bei denen 2 Euterviertel mit einem IMD versehen waren. Die Zellzahl in diesen Vierteln stieg rasch an und stabilisierte sich etwa 50 % über der der anderen Viertel. Die Milchleistung und die Anteile von Fett und Protein in der Milch veränderten sich nicht. Nach der Injektion von Endotoxin in das Euter stieg die Zellzahl in den Vierteln mit IMD auf 4,3 Millionen Zellen / ml und in den Vierteln ohne IMD auf 1,8 Millionen Zellen / ml Milch. Nachdem die Viertel mit *S. aureus* infiziert waren, entwickelten 9 von 10 unbehandelten und 5 von 10 behandelten Vierteln eine Mastitis (PAAPE et al. 1981b).

In einer späteren Untersuchung dagegen manifestierte sich mit gleichem Versuchsaufbau in allen Vierteln eine Infektion mit *S. aureus* (SCHULTZE u. PAAPE 1984).

Der Einfluss von rekombinantem bovinem IFN-γ auf die Aktivität von PMN aus Milch wurde ebenfalls untersucht (SORDILLO u. BABIUK 1991). Parameter der Zellaktivität waren in dieser Untersuchung die Phagozytose, die bakterizide Aktivität und die CL-Aktivität. Ein Teil der PMN wurde nochmals in Milch inkubiert, ein Teil in Puffer: Nach Behandlung mit IFN-γ zeigten beide Gruppen deutlich stärkere Aktivitäten (s. Tabelle 7).

2.6 Zielsetzung der eigenen Untersuchungen anhand des aktuellen Forschungsstandes

Funktionalitätsuntersuchungen aus Milchzellen sind in der Literatur kaum beschrieben, sodass keine fest etablierten Verfahren zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden veröffentlichte Methoden zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität und der CL-Aktivität auf das Medium Milch übertragen und teilweise modifiziert.

Im Versuchsteil wurde zunächst versucht, die Interpretationsmöglichkeiten funktioneller Parameter zu definieren, da zu dieser Fragestellung bisher wenig Daten publiziert wurden. Dazu sollten klassische Entzündungsparameter wie die Zellzahl in Milch mit immunologischen Parametern in einen Zusammenhang gebracht und festgestellt werden, welche Gemeinsamkeiten und welche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Parametergruppen bestehen.

Weiterhin wurde nach Grenzwerten gesucht, die dazu beitragen, den Gesundheitszustand eines Euterviertels zu beschreiben. Einige Studien beschäftigten sich mit der zellulären Reaktion in einem Euterviertel auf einen spezifischen Reiz, z. B. Endotoxin oder verschiedenen Bakterien. Auch der Einfluss einer Antibiose auf die CL-Aktivität wurde mehrfach untersucht. Hierbei wurden hauptsächlich Fragestellungen zum Ablauf perakuter Infektionen bearbeitet. Ergänzend dazu wurde in der vorliegenden Ar-

beit die Zellaktivität von Tieren mit chronischen, subklinischen Mastitiden unter moderat erhöhten Zellzahlen bestimmt.

Die gegenseitige Beeinflussung der Euterviertel eines Tieres wurde in Veröffentlichungen kaum thematisiert. SCHRÖDER (2003) machte zu dieser Frage erstmalig Angaben hinsichtlich Zellmorphologie und Zelldifferenzierung, welche in der vorliegenden Studie aufgegriffen und auf funktionelle Eigenschaften von Milchzellen erweitert wurden.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die methodischen Versuche mit Blutzellen (Abschnitte 3.9.1 und 3.9.2) wurden Tiere der Klinik für Rinder und der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover beprobt. Die übrigen Versuche (Abschnitte 3.9.3 – 3.9.5) wurden mit Kühen des Lehr- und Forschungsguts Ruthe der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Betrieb 1) und des Landwirtes Thomas Meldau in Adelheidsdorf (Betrieb 2) durchgeführt.

3.1.1 Versuchstiere für die methodischen Versuche

Die Blutproben für die Versuche zur CL-Aktivität wurden von vier Versuchstieren, die der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover gehören, gewonnen. Diese Rinder waren ovariektomiert und laktierten daher nicht.

Tier 1 = Ohrmarke Nr. 07412
Tier 2 = Ohrmarke Nr. 62973
Tier 3 = Ohrmarke Nr. 07411
Tier 4 = Ohrmarke Nr. 07409

Für die methodischen Versuche zur Phagozytoseaktivität standen diese klinikeigenen Tiere nicht zur Verfügung. Statt dessen wurden Patienten der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover zufällig ausgewählt und beprobt.

3.1.2 Betrieb 1

Das Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Tierärztlichen Hochschule Hannover hatte eine Herde mit ca. 80 laktierenden Tieren (Deutsche Holstein Farbrichtung Schwarzbunt), die eine durchschnittliche Jahresleistung von etwa 9.500 kg aufwies. Die Herde war in zwei Gruppen aufgeteilt, eine Gruppe im konventionellem Melksystem und

eine Gruppe im automatischen Melksystem. Im konventionellen Melksystem wurde zweimal täglich von 4.30 – 6.30 Uhr und von 14.30 – 16.30 Uhr in einem Doppel-Vierer Autotandem Melkstand der Firma DeLaval gemolken, während im automatischen Melksystem (VMS) ein Melkroboter des gleichen Herstellers rund um die Uhr betriebsbereit war. Hier kamen die Kühe (im Rahmen bestimmter Mindest- und Höchstintervalle) in einem individuellen Rhythmus zum Melken. Die Gruppe aus dem konventionellen Melksystem war in einem Tiefstreustall mit Fressgitter untergebracht, die Gruppe des VMS stand im Boxenlaufstall auf Spaltenboden, ein Fressgitter war auch hier vorhanden. Das Grundfutter wurde in Form einer aufgewerteten Mischration verabreicht, das Kraftfutter stand über eine Transponderfütterung am Kraftfutterautomaten zur Verfügung. Wasser wurde ad libitum angeboten.

3.1.3 Betrieb 2

Der Landwirt Thomas Meldau molk täglich etwa 80 Kühe der Rasse Deutsche Holstein Farbrichtung Schwarzbunt um 5.30 Uhr und um 17 Uhr (durchschnittliche Jahresleistung: ca. 8.000 kg) in einem Doppel-Sechser Fischgrätenmelkstand der Firma Westfalia. Seine Tiere wurden in einem Boxenlaufstall mit Spaltenboden gehalten und hatten im Sommer tagsüber Weidegang. Zum Grundfutter aus Grassilage wurde ergänzend Kalk und Mineralfutter angeboten, das Kraftfutter wurde wiederum über einen Automaten verabreicht. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

3.2 Probenahme

3.2.1 Blut

Nach Anlegen der Staukette wurde die zu punktierende Hautstelle mit Alkohol gereinigt und aus der gestauten V. jugularis die gewünschte Blutmenge im Vacutainersystem entnommen.

Für die methodischen Versuche wurde EDTA-Blut in unterschiedlichen Mengen verwendet. Pro Tier 30 ml ETDA-Blut und 10 ml Blutserum benötigt.

Die Blutentnahme an den Tieren aus dem Betrieb 1 erfolgte nach dem Melken und an den Tieren aus dem Betrieb 2 unmittelbar davor. Während des Transports und bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben kühl gelagert.

3.2.2 Milch

Von den zu untersuchenden Tieren wurden aus jedem funktionellen Viertel Milchproben entnommen. Dabei wurden pro Viertel drei unterschiedliche Fraktionen gewonnen:

- Vorgemelk
- Viertelanfangsgemelk
- Viertelhandgemelk

Die Probeentnahme fand während der Morgenmelkzeit statt, die der Tiere aus Betrieb 1 / Gruppe VMS entsprechend zur Morgenmelkzeit der konventionellen Gruppe. Von diesen Tieren wurden die Proben gelegentlich aus betriebstechnischen Gründen ca. eine Stunde später genommen.

Der Transport der Proben erfolgte zügig und bei Bedarf mit Kühlung durch Kühlelemente zum Institut, wo sie bis zur weiteren Verwendung bei 4° C aufbewahrt wurden.

3.2.2.1 Vorgemelk

Im Melkstand wurden die ersten Milchstrahlen des unstimulierten Euterviertels mit dem Leitfähigkeitsmessgerät Mastitron® aufgefangen und ihre Leitfähigkeit bestimmt.

3.2.2.2 Viertelanfangsgemelk (VAG)

Die Zitze und das Euter wurden zunächst trocken gereinigt und anschließend desinfiziert. Dafür wurde Haushaltspapier, das mit 70 %igem Alkohol getränkt war, verwendet. 10 ml Milch wurden in ein steriles Glasröhrchen gemolken, das umgehend wieder verschlossen wurde.

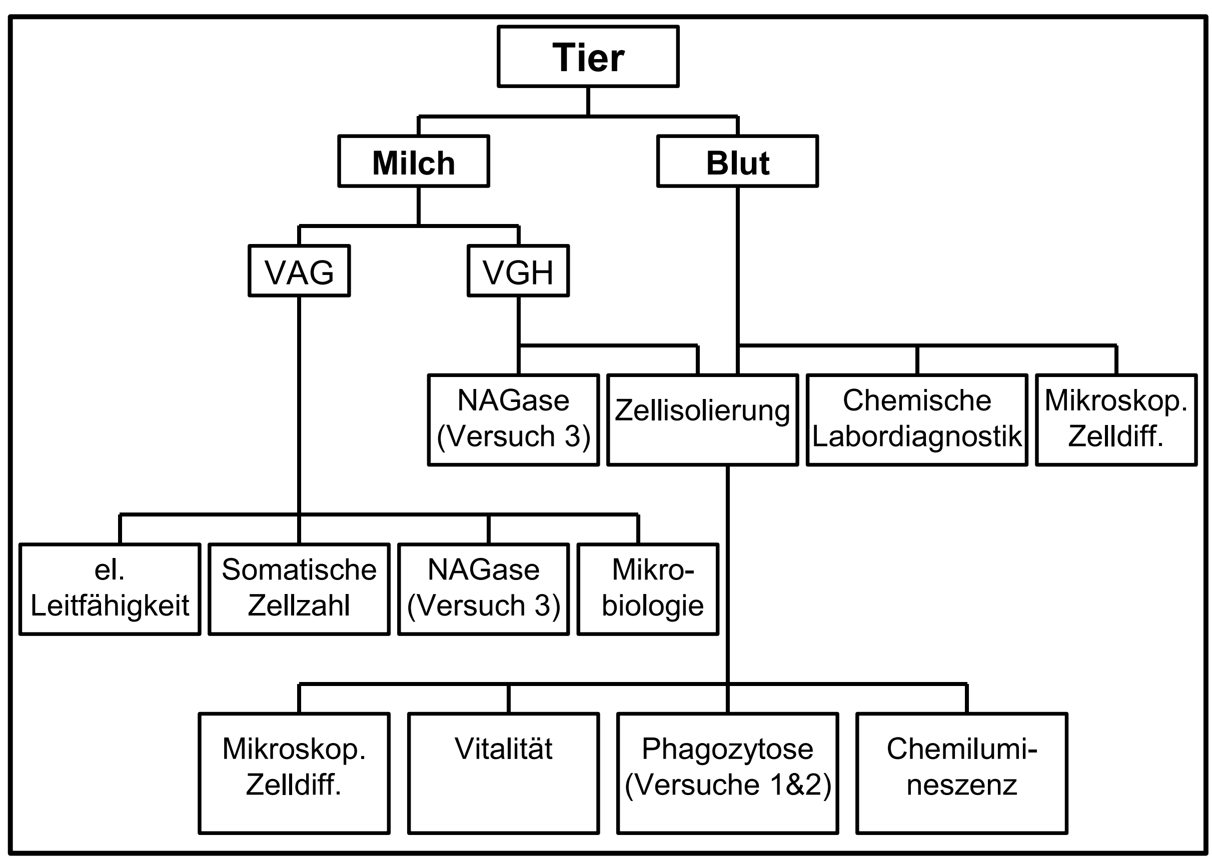


Abbildung 2: Untersuchungen aus Blut- und Milchproben

3.2.2.3 Viertelhandgemelk (VGH)

Im Anschluss an die Entnahme des VAG erfolgte die Gewinnung des Viertelhandgemelkes in sterilen Babyflaschen (250 ml). In der Regel wurde je Viertel eine Babyflasche Milch ermolken, für Versuch 3 wurden zwei Flaschen (500 ml) je Euterviertel benötigt.

Die durchgeführten Untersuchungen aus den Blut- und Milchproben sind in Abbildung 2 dargestellt.

3.3 Allgemeine Probenanalyse

3.3.1 Geräte

Autoklav Varioklav® Dampfsterilisator	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Blutanalysegerät Hematology Analyzer, Modell MEK – 6108G für Veterinärmedizin	NIHON KOHDEN, Bad Homburg
Elektrische Zählhilfe Assistent Counter® AC – 8	Karl Hecht Assistent GmbH, Altnau TG, Schweiz
Fluorometer Fluoroscan®	Labsystems, Helsinki/SF
Fossomatic®	Foss Electric, Dänemark
Hamburg MS 1 Minishaker IKA®	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Heidolph Reax top	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Heißluftsterilisator	Rubarth Apparate GmbH, Hannover
Kühlzentrifuge Sigma® 4K-1	Sigma, Osterode
Leitfähigkeitsmessgerät Mastitron® plus V	Milku, Uelzen
Lichtmikroskop Zeiss Axiolab	Zeiss, Oberkochen
Staukette nach Hauptner	Eickemeyer, Tuttlingen
Sterildrucktopf	Millipore Corporation, Bedford/USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach

3.3.2 Glas- und Einmalartikel

Glas- und Einmalartikel sind für alle Methoden an dieser Stelle beschrieben.

Eindrückstopfen farblos	Sarstedt AG (65.793), Nümbrecht
Einmalösen 10 µl	Landgraf Laborgeräte OHG (02P1621403), Langenhagen
Filtrationseinheit, Porengröße 0,2 µm	Sarstedt AG (83.1826.001), Nümbrecht
Glasflaschen Duran® mit Schraubverschluss 50 ml, 500 ml und 5 l	Landgraf Laborgeräte OHG (11 21 85117, 11 21 85144 und 11 21 85173), Langenhagen
Kanülen Precision Glide™ 38 mm, 20 G 1 ½’’, steril	Becton Dickinson (360215), Heidelberg
Messpipetten 10 ml Brand, aus Glas	Landgraf Laborgeräte OHG (14 49 12758), Langenhagen
Milchflaschen 250 ml Jenaer Glas	Schott (3501), Mainz
Objektträger 76 x 26 mm	IDL (190000004), Nidderau
Pasteurpipetten aus Glas, 10 ml	Anfertigung von Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Reagenzglas Duran® 10 ml	Schott Glaswerke, Mainz
Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG (62.554.502 und 62.547.254), Nümbrecht
Röhrchen, 13 ml	Sarstedt AG (55.468), Nümbrecht
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml (Eppendorf Reaktionsgefäße)	Eppendorf (0030120.086), Hamburg

Standardtips,	Eppendorf, Hamburg
2 – 200 µl	0030 000.870
50 – 1000 µl	0030 000.919
1 – 5 ml	0030 000.978
Transferpipetten 3,5ml	Sarstedt AG (86.1171.010), Nümbrecht
Vacutainer Adapters™	Becton Dickinson (364887), Heidelberg
Vacutainerröhrchen™, 7 ml, mit 0,084 ml 0,34 M EDTA	Becton Dickinson (367655), Heidelberg
Vacutainerröhrchen™, 10 ml, ohne Zusatz	Becton Dickinson (368430), Heidelberg

3.3.3 Reagenzien

Bronopol	Merck Eurolab GmbH (8.17017.0250), Darmstadt
Ethanol 94 % Vol, denaturiert (Brennspiritus)	CG Chemikalien, Laatzen
Färbesystem Hemacolor	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Fixierlösung	Nr. 1.11955.2500
Farbreagenz rot	Nr. 1.11956.2500
Farbreagenz blau	Nr. 1.11957.2500
Immersionsöl für Mikroskopie	Merck Eurolab GmbH (1.04699.0100), Darmstadt

3.3.4 Medien, Puffer und Lösungen

3.3.4.1 Ethanol für die Desinfektion

Zur Desinfektion der Zitzen und Punktionsstellen wurde 70 %iger Alkohol verwendet, hergestellt aus 700 ml Brennspiritus und Aqua (A.) monodest. ad 1 l.

3.3.4.2 Fixationslösung zur Zellzahlbestimmung aus Milch

Um die Milchproben zur Zellzahlbestimmung zu fixieren, wurden 60 µl Bronopol (10 mg / ml) pro 10 ml Milch eingesetzt.

3.3.4.3 Färbelösungen für mikroskopische Untersuchungen

Die Lösungen aus dem Färbesystem Hemacolor® lagen gebrauchsfertig vor.

3.3.5 Blut

3.3.5.1 Leukozytenzahl (WBC)

Im klinischen Labor der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurde aus den Blutproben der Versuche 1 und 3 die Leukozytenzahl im Gerät Hematology Analyzer bestimmt.

3.3.5.2 Mikroskopische Zelldifferenzierung

3.3.5.2.1 Herstellen und Färben eines Ausstriches

Zur Erstellung eines Differentialzellbildes wurden 10 µl gründlich geschwenktes EDTA-Blut auf dem rechten Rand eines Objektträgers aufgetragen. Mit der Kante eines zweiten Objektträgers wurde dieser Tropfen gleichmäßig von rechts nach links ausgestrichen. Nach Lufttrocknung erfolgte die Färbung mit dem Färbesystem Hemacolor® (Firma Merck Eurolab). Dabei wurde der Ausstrich nacheinander jeweils

etwa 5 bis 8 Sekunden in die Lösungen 1, 2 und 3 getaucht und anschließend unter einem dünnen Wasserstrahl abgespült.

3.3.5.2.2 Differenzieren des Ausstriches

Nachdem der Ausstrich vollständig getrocknet war, konnte er unter dem Lichtmikroskop Axiolab beurteilt werden. 100 Zellen wurden mit 1000facher Vergrößerung unter Ölimmersion und mit einer Zählhilfe beurteilt. Zur Erhöhung der statistischen Sicherheit wurden für die Versuche 1 bis 3 jeweils 300 Zellen differenziert.

3.3.6 Milch

3.3.6.1 Bakteriologie

10 µl VAG wurden mit einer Einmalöse auf der halben Fläche einer Blutagarplatte (Schafblut mit Aeskulin) ausgestrichen. Nach 24 und 48 Stunden Bebrütung bei 37° C wurden die gewachsenen Kolonien nach kulturellen, mikroskopischen und ggf. biochemischen Gesichtspunkten beurteilt. Im Bedarfsfall erfolgte eine Subkultivierung einzelner Kolonien. Die Diagnose ergab sich aus der zusammenfassenden Interpretation aller vorhandenen Befunde.

3.3.6.2 Zellzahlbestimmung

Nach der Entnahme der Proben für die mikrobiologische Untersuchung und die NAGase-Bestimmung wurde das VAG mit 60 µl Bronopol fixiert und bei 4° C gelagert. Der Gehalt somatischer Zellen (Somatic Cell Count = SCC) in der Milchprobe wurde mit dem Gerät Fossomatic® im Zentrum für Tiergesundheit, Milch und Lebensmittelanalytik des Ahlemer Instituts der Landwirtschaftskammer Hannover bestimmt.

3.3.6.3 NAGase

Für diese Untersuchung wurde 1 ml des VAG verwendet, das bis zur Messung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingefroren war.

Die Aktivität des Enzyms NAGase (N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase) wurde nach dem von KITCHEN et al. (1978) und NOGAI et al. (1996) evaluierten Nachweisverfahren im Fluorometer bestimmt. Die Messung basiert auf dem Prinzip, dass das Enzym NAGase in der Lage ist, das nichtfluoreszierende Substrat 4-Methyl-Umbelliferyl-N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidin (4-MeUNAG) in N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und in die fluoreszierende Substanz 4-Methyl-Umbelliferon (4-MeU) zu hydrolisieren. Die Stärke der Fluoreszenz wird im Fluorometer Fluoroscan® erfasst und in der Einheit nmol $\times$ min^{-1} $\times$ ml^{-1} angegeben.

Die Bestimmung der NAGase-Aktivität erfolgte im VAG, im VGH und im Blutserum (Versuch 3).

3.4 Zellisolierung und mikroskopische Zelldifferenzierung der Zellsuspensionen

3.4.1 Geräte

Analysenwaage Sartorius analytic	Sartorius, Göttingen
Aqua dest. Aufbereitungsanlage GFL-Wasserdestillierapparat (Metall)	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
Autoklav Varioklav® Dampfsterilisator	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Blutanalysegerät Hematology Analyzer, Modell MEK – 6108G für Veterinärmedizin	NIHON KOHDEN, Bad Homburg
Eismaschine Typ UBE 30-10	Ziegra, Isernhagen

Elektrische Pipettierhilfe pipetus® - akku	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Elektronische Mehrkanalpipette Response® 4850, 20 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg
Hamburg MS 1 Minishaker IKA®	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Heißluftsterilisator	Rubarth Apparate GmbH, Hannover
Kühlzentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Sepatech, Hanau
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research®, einstellbar von 500 – 5000 µl, 100 – 1000 µl, 20 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research®, Fixvolumen 50µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Mettler P 1200	Spoerhase AG, Gießen
Quarzdestillierapparat Destamat®	Heraeus, Hanau
Sterildrucktopf	Millipore Corporation, Bedford/USA
Zentrifuge für Deckgläschen („Kaffeemühle“)	Eigenbau der ZA Hygiene und Technologie der Milch (M. Krückeberg) auf Basis einer drehzahlgesteuerten Krups Kaffeemühle, Hannover

3.4.2 Glas- und Einmalartikel

Deckgläschen 18 x 18 mm	IDL (190001818), Nidderau

Weitere verwendete Glas- und Einmalartikel sind in Abschnitt 3.3.2 beschrieben.

3.4.3 Reagenzien

Albumin, bovin, Fraktion V, 98 % pulverisiert (BSA, bovines Serumalbumin)	Life Technologies™ (11018-017), Karlsruhe
DPBS (Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) mit Glucose, Ca^{2+} und Mg^{2+}, 500 ml	Life Technologies™ (14 287-080), Karlsruhe
Einbettmittel Corbit®	I. Hecht, Kiel – Hassesee
Färbesystem Hemacolor	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Fixierlösung	Nr. 1.11955.2500
Farbreagenz rot	Nr. 1.11956.2500
Farbreagenz blau	Nr. 1.11957.2500
Immersionsöl für Mikropskopie	Merck Eurolab GmbH (1.04699.0100), Darmstadt
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 ohne Ca ++/Mg ++	Sigma Aldrich Chemie GmbH (1000 – 3),

3.4.4 Puffer und Lösungen

3.4.4.1 Phophatgepufferte Kochsalzlösung

Ein Beutel PBS-Trockensubstanz wurde in 1 l A. tridest. gelöst. Der pH-Wert betrug 7,4.

Bestandteile:	NaCl	137,0	µmol / ml
	KCl	2,7	µmol / ml
	Na_2HPO_4	8,1	µmol / ml
	KH_2PO_4	1,12	µmol / ml

Zur Herstellung des doppelt konzentrierten PBS (2 x PBS) wurde die doppelte Menge PBS in 1 l A. tridest. gelöst.

Vor Gebrauch wurde der Puffer autoklaviert und kühl gelagert.

3.4.4.2 Nährlösung

750 mg BSA wurden abgewogen und mit DPBS ad 10 g gebracht. Diese Lösung wurde, nachdem das BSA vollständig gelöst war, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und anschließend bei 4° C aufbewahrt.

Zu 28 ml DPBS wurden 2 ml der BSA-Stammlösung gegeben. Die Lösung wurde auf Eis aufbewahrt, sie wurde an jedem Versuchstag neu hergestellt und unter sterilen Bedingungen behandelt.

3.4.5 Blut

3.4.5.1 Zellisolierung

Die Proben und alle Lösungen wurden bis zum Abschluss der Untersuchungen auf Eis gelagert. Sämtliche Lösungen, Glas- und Einmalartikel wurden vor Gebrauch im Autoklaven sterilisiert. Die Proben wurden unter sterilen Kautelen behandelt.

3.4.5.1.1 Entfernen von Plasma und Buffy Coat

22,5 ml EDTA-Blut wurden in ein 50 ml-Röhrchen gegeben und 15 Minuten bei 1000xg und 4° C ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Stillstand der Zentrifuge wurden die Proben erschütterungsarm entnommen. Plasma, Buffy Coat und etwa ein Drittel der Erythrozyten wurden mit einer Pasteurpipette aus Glas vorsichtig abge-

nommen und verworfen. 1 ml Plasma wurden für die spätere Anfertigung der Milchzellausstriche (siehe 3.4.6.2.1) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß auf Eis gelagert.

Nun erfolgte die Zugabe von etwa 30 ml PBS zum Sediment. Nach sanftem Schwenken wurden die Proben nochmals zentrifugiert (s. o.), Überstand, Buffy Coat und etwa die Hälfte der Erythrozyten wurden wie beschrieben entnommen.

3.4.5.1.2 Lyse der Erythrozyten

Durch Rütteln wurde das Sediment vom Boden gelöst.

Jeweils 20 ml A. tridest. bzw. doppelt konzentriertes PBS (2 x PBS) wurden in einem 50 ml-Glasfläschchen vorgelegt. Das vorbereitete A. tridest. wurde nun zur Probe gegeben, die daraufhin 20 Sekunden sanft geschwenkt wurde. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des 2 x PBS.

Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsgang bei 1000xg und 4° C mit automatischer Bremse konnte der Überstand abgegossen und verworfen werden. Das entstandene Zellpellet wurde aufgerüttelt und erneut lysiert.

Diese zweite und die darauf folgende dritte Lyse erfolgten nach dem gleichen Verfahren wie die erste. Es wurden aber nur noch je 10 ml A. tridest. und 2 x PBS verwendet. Nach der dritten Lyse erschien das Pellet reinweiß.

3.4.5.1.3 Waschen der PMN

Nach der Lyse wurde das Pellet aufgerüttelt und mit 10 ml PBS versetzt, bevor der Waschgang (5 Minuten) bei 1000xg und 4° C mit Bremse stattfand. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 500 µl Nährlösung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß
überführt. Durch Nachspülen des 50 ml-Röhrchens mit 500 µl Nährlösung konnten anhaftende Zellen gewonnen werden.

3.4.5.2 Mikroskopische Differenzierung der Blutzellsuspension

Aus der unverdünnten Zellsuspension wurde ein Ausstrich angefertigt und mikroskopisch differenziert, so wie unter 3.3.5.2 für Vollblut beschrieben. Die Zahl der differenzierten Zellen betrug stets 300.

3.4.5.3 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration aus den Zellsuspensionen erfolgte im Hematology Analyzer.

50 µl der Suspension wurden angesaugt, mit isotonischer Lösung verdünnt und nach dem Prinzip der Impedanzmessung mit Hilfe von Kapillaren gezählt.

Nach einmaliger Bestimmung der Konzentration in der Ausgangssuspension wurde diese bei Bedarf mit Nährlösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß verdünnt, bis die gewünschte Arbeitskonzentration von 4 x 10^6 Zellen / ml erreicht war. Anschließend wurde die tatsächliche Konzentration der Arbeitslösung durch eine Zweifachmessung überprüft.

3.4.5.4 Bakteriologie

Zur Bestimmung der Zellfunktionalität war es wichtig, dass die Proben bis zum Beginn der Untersuchungen steril waren. Die Keimfreiheit der Probe wurde mittels Kultivierung auf einer Blutagarplatte überprüft, wie in Abschnitt 3.3.6.1 beschrieben.

Diese Untersuchung fand jeweils mit den Zellsuspensionen Blut und der Nährlösung aus den methodischen Versuchen und Versuch 3 statt. Für die Versuche 1 und 2 wurden diese Proben stichprobenartig auf Keimfreiheit untersucht.

3.4.6 Milch

3.4.6.1 Zellisolierung

Auf durchgehende Eiskühlung der Proben und aller Lösungen bis zum Abschluss der Untersuchungen wurde geachtet. Es wurden nur autoklavierte Lösungen, Glas- und Einmalartikel benutzt. Die Behandlung der Proben erfolgte unter sterilen Kautelen.

3.4.6.1.1 Gewinnung des Milchsediments

200 ml Milch und 200 ml PBS wurden in ein Zentrifugengefäß (450 ml Volumen) gegeben und 15 Minuten bei 1000xg und 4° C ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Fettschicht mit einem Metalllöffel vorsichtig entfernt, und die Magermilch abgegossen. Das am Boden haftende Sediment wurde mit etwa 5 ml PBS versetzt und mit einer Transferpipette in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Im Zentrifugengefäß verbliebene Zellen konnten durch Nachspülen mit ca. 5 ml PBS gewonnen werden. Das 50 ml-Röhrchen wurde nun mit PBS auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt.

Für Versuch 3 bedurfte es einer größeren Menge Milchzellen. Daher wurden pro Probe zwei Zentrifugengefäße wie oben beschrieben befüllt und behandelt. Die Sedimente beider Gefäße wurden dann in einem gemeinsamen Röhrchen aufgefangen.

3.4.6.1.2 Waschen der Zellen

Es folgte ein Zentrifugationsgang von 15 Minuten Dauer bei 400xg und 4° C mit automatischer Bremse. Der Überstand wurde abgegossen, und das Sediment mit einer Pipette in 1 ml PBS resuspendiert. Nachdem die Zellen in ein 15 ml-Röhrchen überführt worden waren, wurde das größere Röhrchen mit 1 ml PBS nachgespült, und das 15 ml-Röhrchen mit PBS auf 10 ml aufgefüllt.

Die sich anschließende Zentrifugation erfolgte bei 300xg 15 Minuten (4° C, mit Bremse). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml PBS vorsichtig aufgerüttelt, wieder mit 9 ml PBS versehen und sanft gemischt.

Der letzte Zentrifugationsschritt verlief wie die vorhergegangenen, jedoch betrug die Beschleunigung lediglich 200xg.

Das Pellet wurde in 250 µl Nährlösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgenommen, und das Röhrchen einmal mit 250 µl Nährlösung nachgespült.

3.4.6.2 Mikroskopische Zelldifferenzierung der Milchzellsuspension

3.4.6.2.1 Herstellen eines Ausstriches

Die Herstellung eines Ausstriches für die mikroskopische Differenzierung geschah nach dem als „Kaffeemühle“ bezeichneten Verfahren. Ein Deckgläschen wurde in die zur Minizentrifuge umgebaute Kaffeemühle plaziert. Auf diesem Deckgläschen wurden zunächst 10 µl Blutplasma mit der Pipettenspitze gleichmäßig verteilt. Anschließend kamen 40 µl unverdünnter Zellsuspension auf das Deckgläschen, die Kaffeemühle wurde etwa drei Sekunden angestellt. Die Geschwindigkeit entsprach ungefähr 200xg. Auf einen vorbereiteten Objektträger, mit einem Tropfen Corbit® versehen, wurde nun das Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette aufgeklebt.

3.4.6.2.2 Differenzieren des Ausstriches

Nach einer Trockenzeit von mindestens einer Stunde wurde der Ausstrich mit dem Färbesystem Hemacolor® angefärbt, wie in Abschnitt 3.3.5.2 beschrieben. Die mikroskopische Auswertung erfolgte analog zu den Blutausstrichen. Da von einigen Proben sehr wenig Material zur Verfügung stand, war es nicht immer möglich, 100 Zellen in einem Ausstrich zu differenzieren. Waren nach 20 Minuten weniger als 20 Zellen differenzierbar, so wurde abgebrochen und der prozentuale Anteil der einzelnen Zellarten mit entsprechendem Vermerk als Ergebnis verwendet.

3.4.6.3 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration wurde wie unter 3.4.5.3 beschrieben gemessen und auf 4×10^6 Zellen / ml verdünnt.

3.5 Vitalitätsbestimmung aus Blut- und Milchzellen

3.5.1 Geräte

Hamburg MS 1 Minishaker IKA®	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACSCalibur®, mit angeschlossener Computereinheit	Becton Dickinson, Heidelberg

Weitere Geräte sind in den Abschnitten 3.3.1 und 3.4.1 beschrieben.

3.5.2 Glas- und Einmalartikel

Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml (FACS-Röhrchen)	Becton Dickinson (35 2008), Heidelberg

Weitere verwendete Glas- und Einmalartikel sind in Abschnitt 3.3.2 dargestellt.

3.5.3 Reagenzien

Propidiumjodid (PJ) MG = 668,4 g / mol	Sigma Aldrich Chemie GmbH (28.707 – 5), Steimheim

3.5.4 Lösungen für die Durchflusszytometrie

3.5.4.1 Sheath fluid

Die Trägerflüssigkeit für die Durchflusszytometrie wurde hergestellt, indem zu sterilfiltriertem PBS (0,2µl-Filter im Dampfdrucktopf) 0,1 mg / ml NaN_3 gegeben wurden.

3.5.4.2 Propidiumjodidlösung

Als Stammlösung diente 1 mg / ml Propidiumjodid in PBS, welche bei -18° C gelagert wurde. Die Gebrauchslösung wurde durch eine 1 : 5 – Verdünnung der Stammlösung mit PBS hergestellt.

In der zu messenden Probe lag Propidiumjodid im Überschuss zwischen 20 und 40 µg / ml vor.

3.5.5 Funktionsweise des Durchflusszytometers

Für eine detaillierte Beschreibung dieses Gerätes wird auf die Dissertation von SCHRÖDER (2003) verwiesen.

In Kürze ist ein Durchflusszytometer ein Gerät, das Partikel in ihrer Größe, Struktur und Fluoreszenzintensität erfasst. Dafür besitzt es einen oder mehrere Laser. Ein Laser sendet in der Regel Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aus. Die zu charakterisierenden Partikel werden in einer Trägerflüssigkeit durch den Laserstrahl hindurchgeführt, stets nur einer zum selben Zeitpunkt. Der Laserstrahl wird dadurch abgelenkt. Ein Detektor gegenüber des Lasers, der sog. Forward Scatter (FSC), erfasst die Dauer und Stärke der Abschwächung des Strahls und damit die Größe des Partikels. Ein weiterer Detektor, der im 90°-Winkel zum Laserstrahl angebracht ist, empfängt die Stärke des Seitwärtsstreulichts. Er wird Side Scatter (SSC) genannt und beschreibt Oberflächenbeschaffenheit und Granularität des Partikels.

Sendet der Partikel im Laserstrahl eine Fluoreszenz aus, so stehen Fluoreszenzdetektoren in verschiedenen Wellenlängen (Grün-: 500 – 560 nm, Orange-: 543 – 627 nm und Rotfluoreszenz: > 650 nm) zur Verfügung, die die Intensität der Fluoreszenz an die Messeinheit weitergeben. Ein zweiter Laser (Anregungswellenlänge 635 nm) registriert eine zusätzliche Fluoreszenz im Rotbereich (645 – 676 nm). Auf diese Weise können bis zu vier verschiedene fluoreszierende Farbstoffe während einer Messung erkannt werden (SCHRÖDER 2003).

Die Auswertung einer Probe erfolgt, nachdem meist mehrere tausend Partikel dieser Probe gemessen wurden. Der an das System angeschlossene Computer ermöglicht die statistische Auswertung der Daten.

3.5.6 Prinzip

Zur Markierung somatischer Zellen sind Fluorochrome wie Propidiumjodid (PJ) geeignet. Diese Farbstoffe reagieren mit Teilen der DNA membrandefekter Zellen, wodurch lebende (membranintakte) von toten (membrandefekten) Zellen unterschieden werden können. Die lebenden Zellen werden nicht angefärbt. Ebenso wenig werden Zellreste, die keine DNA enthalten, registriert. PJ wird im Durchflusszytometer vom Fluorezenzdetektor FL3 erkannt.

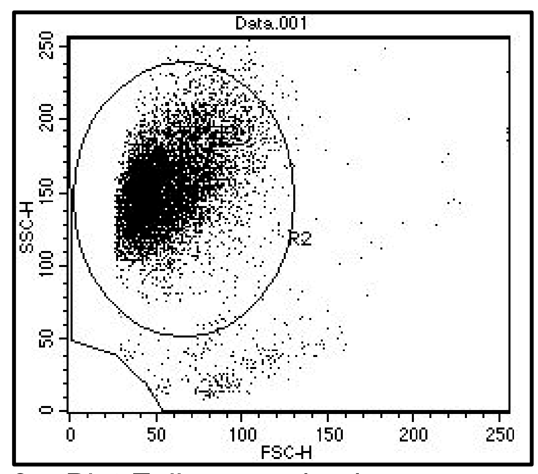
3.5.7 Durchführung

In einem FACS-Röhrchen wurden 400 µl Nährlösung mit 100 µl Zellsuspension (4 x 10^6 Zellen / ml) aus Blut oder Milch und 50 µl Propidiumjodidlösung gemischt und umgehend im Durchflusszytometer FACSCalibur® (Fa. Becton Dickinson) gemessen. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte im Dunkeln und auf Eis. Nach der Registrierung von 10.000 Partikeln je Probe wurde die Messung beendet und ausgewertet.

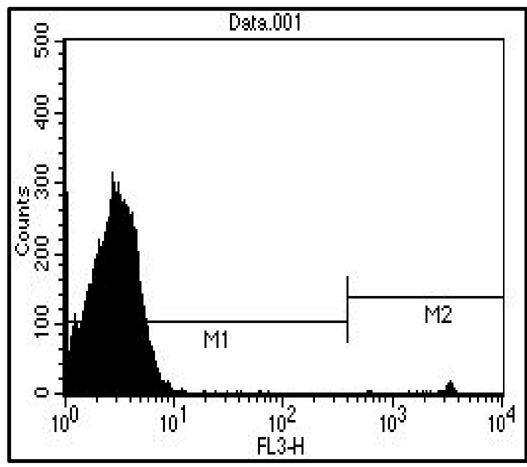
3.5.8 Auswertung

Für die Auswertung wurde die Software CellQuest Pro® benutzt, mit der die Messereignisse zunächst in einem Punktdiagramm (FSC/SSC-Dot Plot, s. Abbildung 3a und 3c) dargestellt wurden. Aufgrund der charakteristischen Größe und Struktur war es möglich, den Bereich für PMN zu identifizieren. Nur die in diesem Bereich liegenden Events wurden für die weitere Auswertung verwandt. Weiter wurde ein Histogramm erstellt, in dem auf der x-Achse die Stärke der Fluoreszenz im Detektor FL3 der PMN dargestellt wurde (s. Abbildung 3b und 3d). Durch Festlegen eines Bereiches (Gate),

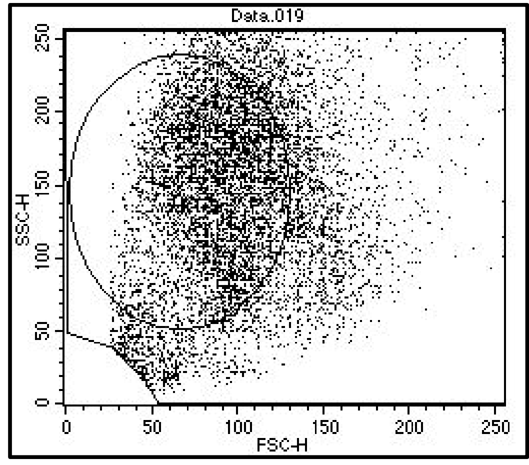
in dem die Partikel als PJ-positiv (angefärbt) bezeichnet werden, wird der Anteil der fluoreszierenden Partikel (hier nur PMN) an der Gesamtmenge der PMN berechnet. Die einmal festgelegten Bereiche für PMN und für die Unterscheidung zwischen angefärbten (M2) und nicht angefärbten Partikeln (M1) wurden für sämtliche Proben unverändert eingesetzt.



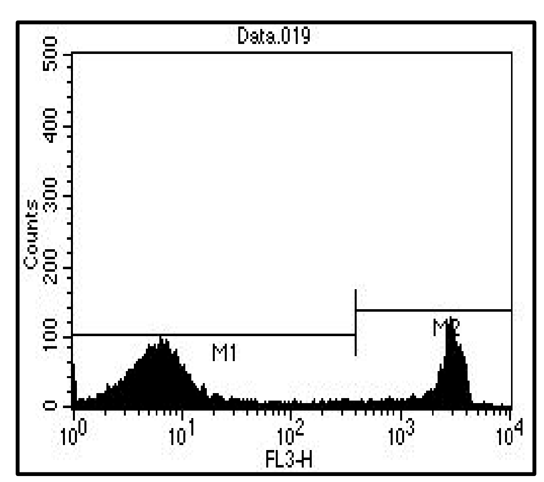
3a: Blut-Zellsuspension im FSC/SSC-Dot Plot



3b: Blut-Zellsuspension im FL3-Histogramm



3c: Milch-Zellsuspension im FSC/SSC-Dot Plot



3d: Milch-Zellsuspension im FL3-Histogramm

Abbildung 3a bis 3d: Auswertung der Vitalitätsbestimmung im Durchflusszytometer; Erklärung siehe Text

3.6 Phagozytoseaktivität aus Blut- und Milchzellen

3.6.1 Geräte

Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACSCalibur® , mit angeschlossener Computereinheit	Becton Dickinson, Heidelberg
Hamburg MS 1 Minishaker IKA®	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach

Weitere Geräte sind in den Abschnitten 3.3.1 und 3.4.1 beschrieben.

3.6.2 Glas- und Einmalartikel

Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml (FACS-Röhrchen)	Becton Dickinson (35 2008), Heidelberg

Weitere verwendete Glas- und Einmalartikel sind in Abschnitt 3.3.2 dargestellt.

3.6.3 Reagenzien

Fluoreszeinisothiocyanat Isomer 1 (FITC)	Sigma (F 7250), Taufkirchen
Omnisorbin™	Calbiochem (496250), Bad Soden

3.6.4 Medien

3.6.4.1 Gepooltes Rinderblutserum

Serumblutproben von mindestens zehn Rindern wurden zentrifugiert (1400xg, 15 Minuten, 4° C). Die Überstände der Proben wurden gemeinsam in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen, gut gemischt und anschließend in 500-µl-Aliquots bei -18° C eingefroren.

3.6.4.2 Bakteriensuspension

3.6.4.2.1 Stammlösung

Die Bakteriensuspension wurde von der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Zur ihrer Herstellung wurde ein Puffer aus 0,1 M Na_2CO_3 und 0,1 M NaCl mit einem pH-Wert von 9,2 benötigt. 1 mg FITC wurden in 15 ml Puffer vollständig gelöst. Zur Markierung der *S. aureus* wurden 0,3 ml Omnisorbin™ mit 0,7 ml des FITC-Puffers und 5 µl 10 % NaN_3 gemischt, sodass eine Suspension mit der Endkonzentration von 0,05 % FITC entstand. Diese Suspension wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur im 1,5 ml-Reaktionsgefäß inkubiert.

Es folgten drei Waschgänge in PBS bei 1400xg. Unter Zuhilfenahme eines UV-Lichtmikroskopes und einer Zählkammer wurde die Konzentration der Suspension auf 2 x 10^8 Bakterien / ml eingestellt. Die Suspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei -18° C gelagert.[1]

---

[1] Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover:
FITC-Markierung von Bakterien für Phagozytose-Assay.
Persönliche Information

3.6.4.2.2 Arbeitslösung

Unmittelbar vor Beginn der Phagozytosemessung wurden zwei verschiedene Arbeitslösungen vorbereitet: Ein mit „n" (nicht opsonisiert) beschriftetes 13 ml-Röhrchen wurde mit 2 ml PBS und 1 ml Bakteriensuspension beschickt, während ein mit „o" (opsonisiert) beschriftetes 13 ml-Röhrchen 1,8 ml PBS, 0,2 ml gepooltes Rinderblutserum (s. Abschnitt 3.6.4.1) und 1 ml Bakteriensuspension enthielt. Die Endkonzentration an *S. aureus* betrug in diesen Lösungen 0,7 x 10^{8} / ml. Nach einer 15-minütigen Vorinkubation bei 37° C im Wärmeschrank wurden die Arbeitslösungen umgehend zum Einsatz gebracht.

3.6.4.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie

s. Abschnitt 3.5.4

3.6.5 Prinzip

Für diese Untersuchung wurden *S. aureus* eingesetzt, die mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC markiert wurden. Diese Bakterien wurden gemeinsam mit isolierten PMN inkubiert. Anschließend konnte im Durchflusszytometer der Anteil der PMN, die Bakterien phagozytiert hatten, anhand der Fluoreszenz bestimmt werden.

3.6.6 Durchführung

Die Vorbereitung und Vorinkubation der bakterienhaltigen Arbeitslösungen ist in Abschnitt 3.6.4.2 beschrieben. Die Arbeitslösung der Zellsuspension Milch oder Blut wurde auf eine Konzentration von 2 x 10^{6} Zellen / ml gebracht, indem 200 µl Zellsuspension mit 200 µl PBS gemischt wurden.

Nun wurde eine Mikrotiterplatte folgendermaßen belegt: Von jeder Probe wurden viermal je 100 µl Zellsuspension in eine Vertiefung (Well) pipettiert. Zu zwei dieser Wells wurden jeweils 100 µl Bakterien aus dem Röhrchen „n" gegeben, zu den beiden anderen Wells entsprechend 100 µl Bakterien aus dem Röhrchen „o".

Nach dem Aufrütteln wurde die Mikrotiterplatte in den 37° C-Wärmeschrank gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Platte einmal entnommen und auf dem Rüttler neu gemischt. Zum Beenden der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte 15 Minuten lang auf Eis gestellt.

Nun wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt, wobei die beiden Ansätze „n“ bzw. „o“ jeweils gemeinsam in einem Röhrchen aufgefangen wurden. Zuletzt befanden sich in jedem FACS-Röhrchen etwa 400 µl Probe.

Einige Milchzellsuspensionen enthielten in ihrer unverdünnten Form weniger als 3 x 10^6 Zellen / ml. Diese Proben wurden nicht verdünnt. Um Probenmaterial zu sparen, wurde auf Doppelansätze verzichtet. Hier beschränkte sich das Volumen im FACS-Röhrchen auf 200 µl pro Probe.

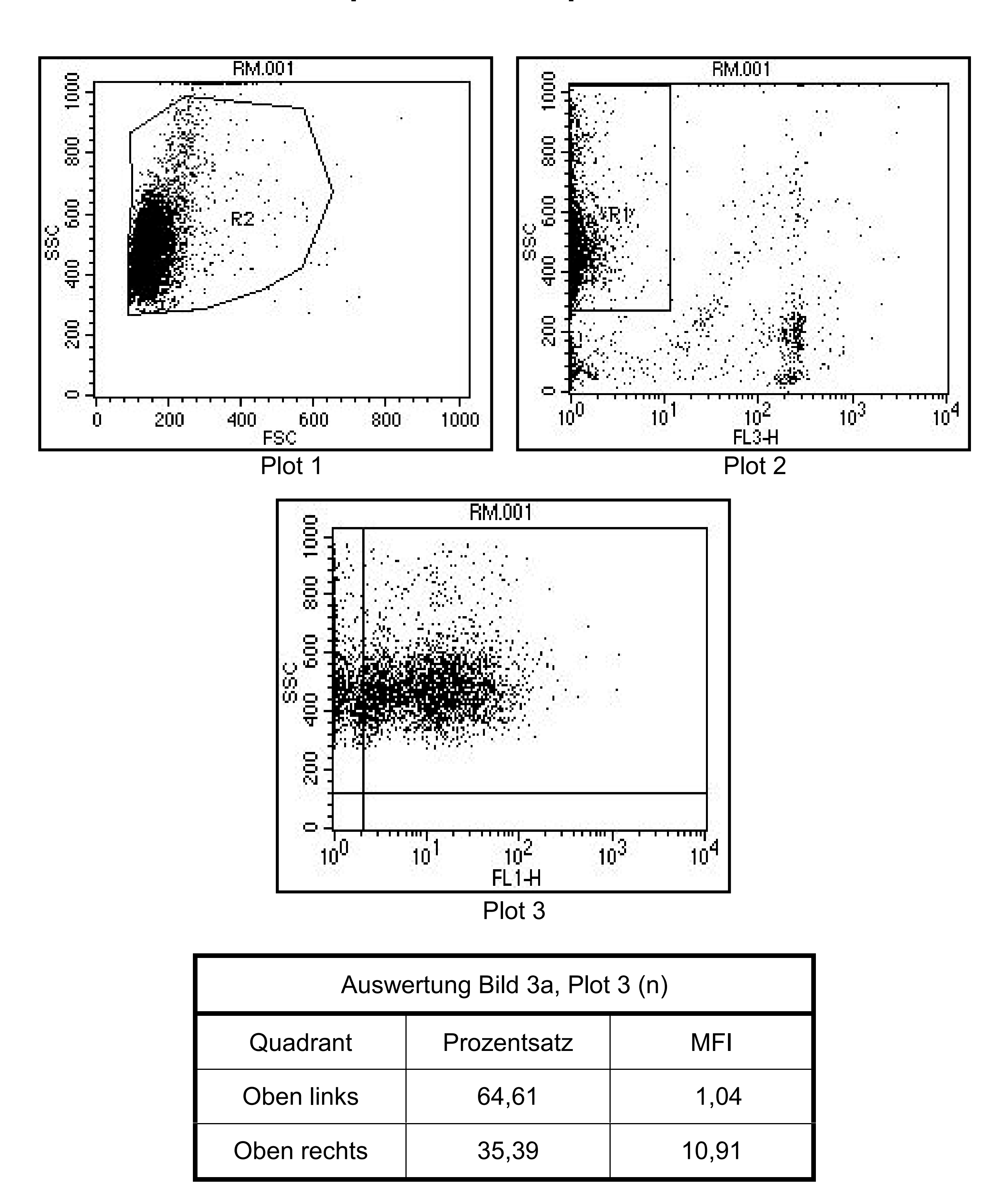
Es folgten die Zugabe von 50 µl Propidiumjodid zu jedem FACS-Röhrchen und die Lagerung bis zur Messung auf Eis und im Dunkeln.

Im Durchflusszytometer wurden von jeder Blutprobe 10.000 und von jeder Milchprobe 40.000 Partikel gemessen. Dabei wurden pro Event die Parameter Größe (FSC), Struktur (SSC), die grüne Fluoreszenzintensität durch FITC (FL1) und die rote Fluoreszenzintensität durch PJ (FL3) ermittelt.

3.6.7 Auswertung

An der angeschlossenen Computereinheit wurden die Proben mit Hilfe der Software CellQuest Pro® unter folgenden Gesichtspunkten ausgewertet: Alle Zellen, die in FL3 deutlich fluoreszierten, waren membrandefekt und nicht vital. Diejenigen Zellen, die nicht angefärbt waren, wurden im FL3-Histogramm durch Setzen eines geeigneten Gates ausgewählt (s. Abbildungen 4a und b, Plot 1). Von diesen Zellen wurden diejenigen selektiert, die sich im FSC/SSC-Dot Plot in dem für PMN üblichen Bereich befanden (s. Abbildungen 4a und b, Plot 2).

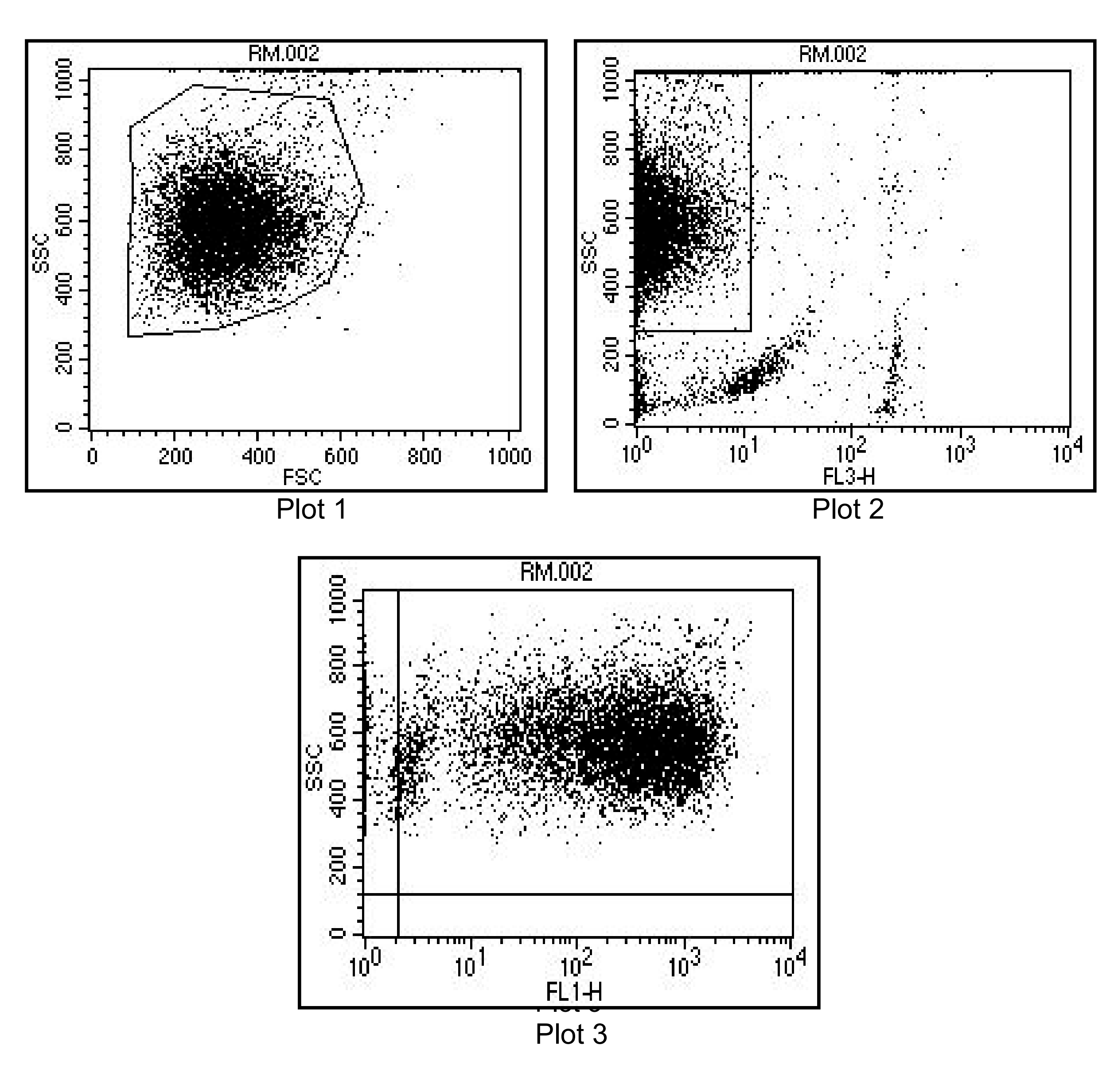
Blutprobe, nicht opsonisiert



Auswertung Bild 3a, Plot 3 (n)		
Quadrant	Prozentsatz	MFI
Oben links	64,61	1,04
Oben rechts	35,39	10,91

Abbildung 4a: Auswertung der Phagozytosemessung im Durchflusszytometer; Erklärung siehe Text

Blutprobe, opsonisiert



Auswertung Bild 3b, Plot 3 (o)		
Quadrant	Prozentsatz	MFI
Oben links	7,73	1,11
Oben rechts	92,27	188,36

Abbildung 4b: Auswertung der Phagozytosemessung im Durchflusszytometer; Erklärung siehe Text

Die vitalen PMN wurden nun in einem FL1-Histogramm dargestellt. Im Detektor FL1 wird der fluoreszierende Farbstoff FITC registriert, mit dem die Bakterien markiert waren. PMN, die FITC-positiv waren, hatten Bakterien phagozytiert (s. Abbildungen 4a und b, Plot 3). Auf diese Weise entstand eine Aussage über den Prozentsatz lebender PMN, die Bakterien aufgenommen hatten. Darüber hinaus konnte über die mittlere Intensität der Fluoreszenz (MFI) auch abgeschätzt werden, wie viele Bakterien pro Zelle aufgenommen worden waren (s. Abbildungen 4a und b).

Auch für diese Auswertung wurden die Felder einmal festgelegt und dann für alle Proben unverändert angewandt, um technische Schwankungen in der Auswertung zu vermeiden.

Die Phagozytosekapazität wurde in den Proben der Versuche 1 und 2 untersucht.

3.7 Chemilumineszenz aus Blut- und Milchzellen

3.7.1 Geräte

Microprocessor pH-Meter pH 539	WTW, Weilheim
Luminometer, Modell Luminoscan Ascent® Typ 392 mit angeschlossener Computereinheit	Labsystems, Helsinki/SF

Weitere Geräte sind in den Abschnitten 3.3.1 und 3.4.1 beschrieben.

3.7.2 Glas- und Einmalartikel

Mikrotiterplatten für Chemilumineszenzversuche: 96-well-Platten, Farbe: weiß, Flachboden	Nunc GmbH (13 61 01), Wiesbaden

Weitere Glas- und Einmalartikel sind in Abschnitt 3.3.2 beschrieben.

3.7.3 Reagenzien

DMSO (Dimethylsulfoxid) MG = 78,13 g / mol	Sigma Aldrich Chemie GmbH (99H3655), Steimheim
Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) MG = 155,16 g / mol	Sigma Aldrich Chemie GmbH (20666-12-0), Steimheim
Natronlauge (NaOH), 0,5 mol / l, 1 l	Merck Eurolab GmbH (9138), Darmstadt
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) g / mol	Sigma Aldrich Chemie GmbH MG = 616,8 (16561-290), Steimheim

3.7.4 Puffer und Lösungen

3.7.4.1 Luminollösung

3.7.4.1.1 Stammlösung

1,1798 g Luminol wurden in 50 ml DMSO gelöst. Die Luminolkonzentration in der Lösung betrug 0,3112 mol / l. Sie wurde bei -80° C unter Lichtausschluss gelagert.

3.7.4.1.2 Arbeitslösung

40 ml DMSO wurden in einem Messkolben vorgelegt, mit 10 ml Stammlösung versetzt und anschließend mit A. tridest. auf 100 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, sodass eine 1:10-Verdünnung entstand. Die Lösung wurde gut geschüttelt, mit Aluminiumfolie umwickelt, in ein Eiswasserbad gestellt und zuletzt im Exsiccator unter Vakuum entgast.

Die Arbeitslösung wurde in 1-ml-Aliquots bei -80° C und vor Lichteinfall geschützt aufbewahrt.

3.7.4.2 PMA-Lösung

3.7.4.2.1 Stammlösung

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 5 mg PMA in 1 l DMSO gelöst und bei -18° C aufbewahrt.

3.7.4.2.2 Arbeitslösung

Dazu wurden 200 µl Stammlösung mit 4800 µl DMSO verdünnt. Die entstandene Arbeitslösung hatte eine Konzentration von 200 µg PMA / 1 ml DMSO.

Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei -18° C gelagert.

3.7.4.3 Reaktionslösung

500 ml DPBS wurden mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 10,0 eingestellt. Dabei musste der pH-Wert der Lösung regelmäßig kontrolliert und ggf. korrigiert werden.

Unmittelbar vor der Messung der Chemilumineszenz wurden zu

- 19 ml Reaktionslösung
- 1 ml Luminol-Arbeitslösung und
- 0,1 ml PMA-Arbeitslösung gegeben.

Die Endkonzentration für Luminol betrug 666 nmol / ml, die für PMA 1.000 ng / ml in der Reaktionslösung.

3.7.5 Funktionsweise des Luminometers

Das Luminometer Luminoskan Ascent® nimmt die Proben in weißen Mikrotiterplatten auf. Es ist für Mikrotiterplatten aller gängigen Größen (1 bis 384 Wells) geeignet. Die Lumineszenzkraft wird für jedes Well einzeln bestimmt.

Das Gerät verfügt über einen Elektronenvervielfältiger, mit dem Licht in einer Wellenlänge von 270 – 670 nm detektiert wird. Die Sensitivität liegt < 1 fmol ATP / Well. Er-

gebnisse in der Höhe von 0,0001 bis 5.000 RLU (relative light units) werden während des Messvorganges erfasst.

Mit Hilfe der Software Ascent™ können die Schritte Dispensieren, Inkubieren, Schütteln und Messen ausgewählt und beliebig in das Arbeitsprotokoll der Messung eingefügt werden. Über Dispenser besteht die Möglichkeit, bis zu drei verschiedene Lösungen während des Messvorganges im Gerät standardisiert in die Wells der Mikrotiterplatte zu geben.

3.7.6 Prinzip

Isolierte PMN werden durch den Aktivator PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) angeregt, freie Sauerstoffradikale zu produzieren. Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazindion) bildet mit Hydrogenperoxid (H_2O_2) 5-Amino-2,3-Phthalat, wobei Stickstoff und Photonen freigesetzt werden. Diese Reaktion läuft nur im alkalischen Milieu ab. Im Luminometer wird das gebildete Licht detektiert. Dabei wird jede Probe innerhalb eines bestimmten Zeitraumes mehrmals gemessen.

3.7.7 Durchführung

Aus technischen Gründen wurde die Messung immer zur selben Uhrzeit durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2). Alle Proben eines Tages wurden in einer Platte gemessen, um die Untersuchungszeit exakt einhalten zu können.

Mit einer 50 µl-Fixpipette wurden in jede Vertiefung (Well) einer sterilen und gekühlten Mikrotiterplatte für Chemilumineszenzversuche 50 µl Probe bzw. Nährlösung (Blindwerte) gegeben.

Der Blindwert (Nährlösung) wurde stets in 12 Wells einer Platte aufgetragen. 5 bis 7 Wells einer Platte wurden jeweils mit der selben Probe belegt. Stand nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung, so wurden entsprechend weniger Wells mit dieser Probe befüllt.

Unmittelbar nach dem Auftragen der Proben wurde die Platte in das Luminometer verbracht. Dort wurde die frisch angefertigte Reaktionslösung mit PMA und Luminol an das Dispensiersystem des Gerätes angeschlossen, und die Messung wurde umgehend gestartet.

Der Start und der Ablauf der Messung wurden von der angeschlossenen Computereinheit mit Hilfe der Ascent Software™ gesteuert. Nach einer von Hand eingerichteten Arbeitsvorlage liefen folgende Schritte stets gleich und vollautomatisch ab:

„Dispense“: Nach dem Start der Messung wurden je 150 µl Reaktionslösung mit einem Dispenser nacheinander in jedes Well gegeben. Die Endkonzentration von Luminol, bezogen auf das Gesamtreaktionsvolumen von 200 µl, betrug nun 500 nmol / ml, die für PMA 750 ng / ml.

„Shake“: Die Proben wurden durch Schütteln bei 600 U / min 3 Sekunden lang gemischt.

„Incubate“: Um die Reaktion zu starten, wurde 10 Sekunden bei 38° C inkubiert.

„Measure“: Die Photonenemission wurde für jedes Well einzeln in 90-Sekunden-Intervallen je 1000 ms lang erfasst. Von jedem Well wurden 30 Einzelwerte in einer Gesamtmesszeit von 45 Minuten erhoben.

3.7.8 Auswertung

Aus den 30 Einzelwerten desselben Wells (s. Abbildung 5) wurde eine Funktionsgleichung erstellt und das Integral abgeleitet. Dieser Wert entspricht dem oxidativen Potential der Probe und wird im weiteren Text als CL-Aktivität (unbereinigt) bezeichnet. Von jedem Well wurden folgende Informationen gespeichert:

- oxidatives Potential als Integral
- Maximum der Kurve (Max)
- Zeit bis zum Erreichen des Maximums (Time)

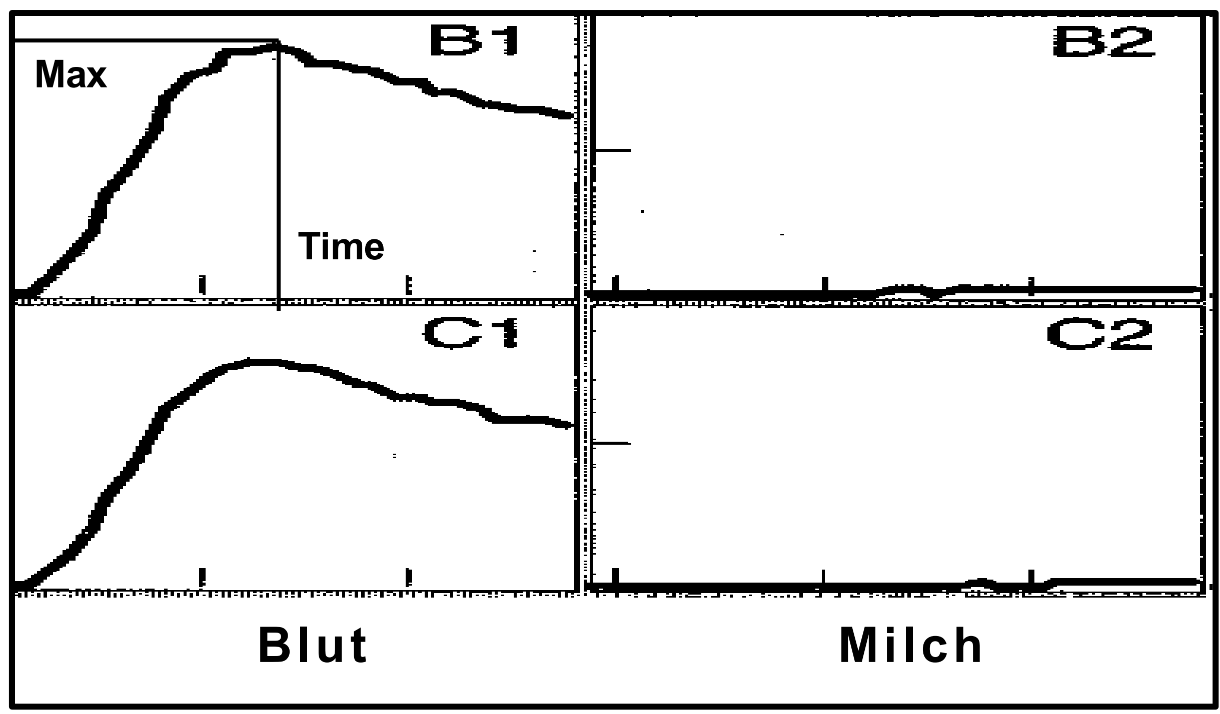


Abbildung 5: Verlaufskurve einer Chemilumineszenzmessung, links aus einer Blutzellsuspension, rechts aus einer Milchzellsuspension; Max: Maximum der Kurve, Time: Zeit bis zum Erreichen des Maximums

CL-Einheiten / 1 Million PMN

Zur Berechnung des Parameters „CL-Einheiten / 1 Million PMN“ waren mehrere Schritte erforderlich. Zunächst wurde aus den Wells, die die selben Proben enthielten, jeweils ein Mittelwert für die Parameter CL-Aktivität (unbereinigt), Max und Time gebildet.

Die Zahl der vitalen PMN im Well wurde anhand der Parameter Zellkonzentration in der Arbeitslösung (a), Prozentsatz PMN in der mikroskopischen Differenzierung (b) und Prozentsatz vitaler PMN in der Vitalitätsbestimmung (c) nach folgender Formel berechnet:

vitale PMN = a x b x c.

Zur Bestimmung der Zahl vitaler eosinophiler Granulozyten wurde entsprechend verfahren.

Die Zahl der errechneten eosinophilen Granulozyten in der Zellsuspension wurde verfünffacht und zur Zahl der PMN hinzugerechnet:

Zahl der PMN (bereinigt) = vitale PMN + 5 x vitale eosinophile Granulozyten

Zuletzt wurde die unbereinigte CL-Aktivität durch die bereinigte Zahl der PMN geteilt und auf eine Million Zellen hochgerechnet:

CL-Aktivität / 1 Mio. PMN = CL x 1.000.000 / Zahl vitaler PMN (bereinigt)

CL-Aktivität / ml Milch

Aus den Milchzellproben wurde noch der Parameter „CL-Aktivität / ml Milch" erhoben. Dieser setzt sich zusammen aus dem Zellgehalt der Milch (a), aus der CL-Aktivität / 1 Million PMN (b), dem Anteil PMN in der Milchzellsuspension (mikroskopisch) (c) und dem Anteil lebender PMN in der Milchzellsuspension (d). Die zur Berechnung nötige Formel lautet:

CL-Aktivität / ml Milch = a x b x c x d

3.8 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel Version 2000 und SAS Version 8e 2002, SAS Institute Inc., Cary, NY durchgeführt.

Die Normalverteilung der Datenbanken wurde mit Microsoft Excel überprüft. Nicht normalverteilte Daten wurden logarithmisch transformiert und nochmals gestestet.

Lineare Korrelationen zweier Parameter zueinander wurde ebenfalls mit dem Programm Excel berechnet.

Mittelwerte, Standardabweichungen, Student´s t-Tests und alle Varianzanalysen wurden mit den entsprechenden SAS-Prozeduren erstellt.

Die Berechnungen von Normalverteilung und Korrelationen wurden aus den Daten der Versuche 1 bis 3 und der Gesamtdatenbank durchgeführt. Mit den Datenbänken der Versuche 1 und 3 und mit der Gesamtdatenbank wurden Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Tests und t-Tests für unabhängige Stichproben berechnet. Aus den Daten von Versuch 3 wurden zudem einfaktorielle Varianzanalysen für wiederholte Messungen und t-Tests für abhängige Stichproben erhoben.

3.9 Versuche

3.9.1 Methodische Versuche zur Phagozytoseaktivität in Blut

Eine grundlegende Methodenbeschreibung für diese Untersuchung wurde von SAAD und HAGELTORN (1985) veröffentlicht. Zusätzlich lag eine Arbeitsanweisung aus der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover[2] vor. Es war jedoch erforderlich, die Methode an die örtlichen und organisatorischen Gegebenheiten anzupassen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf den Parametern Inkubationszeit, Konzentration der Zellen und Konzentration der Bakterien.

Für die unter 3.9.1.1 bis 3.9.1.3 beschriebenen Versuche wurden jeweils PMN eingesetzt, die aus 30 ml EDTA-Blut gewonnen wurden.

3.9.1.1 Inkubationszeit

Unter Einhaltung des oben beschriebenen Versuchsaufbaus (s. Abschnitt 3.6.6) wurde eine Inkubationszeit von

- a) 30 Minuten,
- b) 60 Minuten oder
- c) 90 Minuten

eingehalten. Während der Inkubation wurden die Proben in einem Zeitintervall von 30 Minuten aufgerüttelt.

3.9.1.2 Zellkonzentration

Auch für diese Untersuchung wurde der genannte Versuchsaufbau eingehalten (s. Abschnitt 3.6.6). Die Zellen wurden in einer Konzentration von

---

[2] Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover:
Phagozytoseaktivitätsbestimmung von PMN im FACS.
Persönliche Information

a) 4 Mio. Zellen / ml,
b) 2 Mio. Zellen / ml oder
c) 200.000 Zellen / ml

eingesetzt.

3.9.1.3 Bakterienkonzentration

Bei gleichbleibendem Versuchsaufbau wurden zu 1 ml PBS

a) 100 µl Bakteriensuspension (0,15 x 10^8 / ml Endkonzentration) bzw.
b) 500 µl Bakteriensuspension (0,7 x 10^8 / ml Endkonzentration)

gegeben.

3.9.2 Methodische Versuche zur CL-Aktivität in Blut

Da die Messung der CL-Aktivität hohen technischen Schwankungen unterliegt, wurden bereits vorhandene Methoden (EASMON et al. 1980; HOEBEN 2002) an die örtlichen Gegebenheiten angepasst und optimiert. Ursachen für die Variationen sollten erkannt und minimiert werden. Als Versuchstiere dienten vier klinikeigene Tiere der Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover (s. Abschnitt 3.1.1).

Von jeder Probe wurden die Parameter Vitalität, mikroskopisches Zelldifferentialbild, NAGase, CL-Aktivität / 1 Million PMN, Max und Time erfasst.

3.9.2.1 Zellisolierung bei verschiedenen Temperaturen

Dieser Versuch wurde mit je 60 ml EDTA-Blut von den Tieren 1 bis 4 durchgeführt. Von jeder Blutprobe wurden zweimal je 22,5 ml Blut auf Eis und mit Kühlung der Zentrifuge (Probe 1) bzw. bei Raumtemperatur und ohne Kühlung der Zentrifuge (Probe 2) isoliert. Anschließend wurden alle Proben gemeinsam im Luminometer gemessen.

Gruppe 1 (0° C): Proben 1 der Tiere 1 bis 4
Gruppe 2 (25° C): Proben 2 der Tiere 1 bis 4

Der Versuch wurde einmal wiederholt. Im Rahmen der Auswertung wurde der Fragestellung nachgegangen, in welcher Gruppe die Unterschiede innerhalb eines Tieres von Tag zu Tag größer sind. Weiterhin wurden die Varianzen der Proben von Gruppe 1 mit denen von Gruppe 2 verglichen.

3.9.2.2 Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Blutproben von den Tieren 1 bis 4 wurden untersucht. Nach der Zellisolation wurden je 800 µl Messlösung in drei 13 ml-Röhrchen verbracht und etwa eine Stunde entweder auf Eis (ca. 0° C), bei Raumtemperatur (ca. 25° C) oder im Wasserbad (38° C) inkubiert.

Ansatz 1: Inkubation bei 0° C
Ansatz 2: Inkubation bei 25° C
Ansatz 3: Inkubation bei 38° C

Der Versuch fand an fünf Tagen statt. Nach Abschluss der Untersuchungen wurde anhand von Variationskoeffizienten überprüft, inwieweit die Ergebnisse der drei Ansätze eines Tieres miteinander übereinstimmen.

3.9.2.3 Lagerungsdauer der Proben

Aus Blutproben der Tiere 3 und 4 und von zwei an Mastitis erkrankten Patienten aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurden PMN isoliert. Die Arbeitslösungen wurden auf Eis gelagert und jeweils nach 0, 6, 18 und 24 Stunden auf Vitalität und CL-Aktivität hin untersucht.

Mit diesem Versuch wurde erhoben, in welchem Maße Vitalität und CL-Aktivität nach längerer Lagerung der Proben abfallen.

3.9.2.4 Zellkonzentration

Von den Tieren 1 bis 4 wurden Blutproben gewonnen und aufbereitet (s. Abschnitt 3.4.5.1). Die Zellsuspensionen wurden jeweils dreimal verdünnt.

Zellkonzentration: Ansatz a: 4 Millionen Zellen / ml

Ansatz b: 2 Millionen Zellen / ml

Ansatz c: 1,3 Millionen Zellen / ml

Die CL-Aktivität aller drei Verdünnungen wurde nun in einem Messgang gemessen (s. Abschnitt 3.7.7) und deren Korrelation zur Zellzahl überprüft.

Der Versuch wurde an vier verschiedenen Tagen durchgeführt.

3.9.2.5 PMA-Konzentration

Von den Tieren 1 bis 4 wurden PMN isoliert. Die Reaktionslösung (RL) wurde dreimal mit verschiedenen PMA-Konzentrationen vorbereitet.

RL 1: 0,05 ml PMA (= 375 ng / ml)

RL 2: 0,1 ml PMA (= 750 ng / ml)

RL 3: 0,2 ml PMA (= 1.500 ng / ml)

Nach der Belegung der Mikrotiterplatte (s. Tabelle 8) wurde diese umgehend in das Luminometer eingesetzt und gemessen. Für diesen Versuchsaufbau wurden die Schritte „Dispense“ und „Incubate“ aus dem Programm gelöscht.

Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse wurden daraufhin überprüft, ob Korrelationen zwischen der PMA-Konzentration und der CL-Aktivität bestehen. Weiterhin wurde untersucht, mit welcher Konzentration die Variationskoeffizienten zwischen den Proben einer RL am niedrigsten sind.

Tabelle 8: Belegung der Mikrotiterplatte für die Messung mit unterschiedlichen PMA-Konzentrationen

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tier	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
RL	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3

Reaktionslösung (RL) 1 = 375 ng PMA / ml; RL 2 = 750 ng PMA / ml; RL 3 = 1.500 ng PMA / ml;

3.9.2.6 *pH-Wert*

Von den vier Versuchstieren wurden Blutzellen isoliert, um den Einfluss des pH-Wertes auf die Messung zu untersuchen. Für die Herstellung der Reaktionslösung (RL) wurde das DPBS einmal mit Natronlauge auf den pH-Wert von 10,8 eingestellt, und einmal wurde der pH-Wert von 7,1 belassen. Im ersten Fall ergab sich nach der CL-Messung in der Mikrotiterplatte ein pH-Wert von 8,4, im zweiten Fall ein pH-Wert von 7,2.

RL 1: pH = 10,8

RL 2: pH = 7,1

Nach der Belegung der Mikrotiterplatte (s. Tabelle 9) mit den Zellsuspensionen und den Reaktionslösungen wurde die Messung der Chemilumineszenzaktivität ohne Verzögerung gestartet. Wiederum lief das Programm ohne die Schritte „Dispense“ und „Incubate“.

Der Versuch fand an drei Tagen statt. Die Ergebnisse wurden auf die Variationen zwischen RL1 und RL2 sowie zwischen den Tieren hin überprüft. Hierfür wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten ermittelt.

Tabelle 9: Belegung der Mikrotiterplatte für die Messung mit unterschiedlichen pH-Werten

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tier	1	2	3	4	1	2	3	4				
RL	1	1	1	1	2	2	2	2				

Reaktionslösung (RL) 1 = pH 10,8; RL 2 = pH 7,1

3.9.2.7 Messung der CL-Aktivität aus Vollblut, lysiertem Blut und aufbereiteter Zellsuspension

Blutproben von den Tieren 1 bis 4 wurden analysiert. Vor der Zellisolation wurden etwa 2 ml Vollblut getrennt auf Eis aufbewahrt (Gruppe a). 10 ml jeder Vollblutprobe wurden in ein 50 ml -Röhrchen gegeben und lysiert, wie in Abschnitt 3.4.5.1.2 beschrieben. In diesen Proben waren also alle Leukozyten enthalten, jedoch keine roten Blutkörperchen (= lysierte Proben, Gruppe b). Zusätzlich wurden aus 22,5 ml EDTA-Blut nach dem beschriebenen Verfahren PMN isoliert (Gruppe c) (s. Abschnitt 3.4.5.1).

Gruppe a:	Vollblutproben der Tiere 1 bis 4
Gruppe b:	lysierte Proben der Tiere 1 bis 4
Gruppe c:	isolierte PMN der Tiere 1 bis 4

Nun wurden die CL-Aktivitäten aller Proben (je drei Proben pro Tier) in einer Mikrotiterplatte gemessen.

Nach zweimaliger Wiederholung des Versuches wurden die Ergebnisse der Proben eines Tieres anhand der Korrelationskoeffizienten auf ihre Übereinstimmung getestet.

3.9.2.8 Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages

Zwei Tieren wurden je 60 ml EDTA-Blut entnommen. Von jeder Blutprobe wurden zweimal 22,5 ml Blut aufbereitet.

Tier 1:	Probe 1
	Probe 2
Tier 2:	Probe 3
	Probe 4

Nach Bestimmung der Zellkonzentrationen wurden von den Proben 1 bis 4 je zwei Arbeitslösungen mit der Konzentration von 4 Mio. Zellen / ml hergestellt. Auf diese Weise entstanden pro Tier 4 Arbeitslösungen.

Probe 1:	Arbeitslösung 1a
	Arbeitslösung 1b
Probe 2:	Arbeitslösung 2a
	Arbeitslösung 2b

Nach der Messung wurde die Wiederholbarkeit der Ergebnisse aus den Proben eines Tieres mithilfe von Variationskoeffizienten berechnet. Dabei wurden die Proben 1 und 2 miteinander verglichen, ebenso die beiden Arbeitslösungen a und b jeder Probe.

Die Wiederholbarkeit wurde an vier Tagen untersucht.

3.9.3 Versuch 1: Einfluss der Zahl der erkrankten Euterviertel pro Kuh auf die Zellfunktionalität von PMN aus Milch und Blut

3.9.3.1 Tier- und Probenmaterial

Zur Überprüfung der Aussagefähigkeit der Blutzellaktivität bezüglich der Eutergesundheit wurden in beiden Betrieben gezielt Tiere ausgesucht, die auf allen vier Eutervierteln die Zellzahl von 100.000 Zellen / ml Milch überschritten (Gruppe C). Gleichzeitig wurden Tiere beprobt, deren Milch in allen vier Drüsenkomplexen weniger als 30.000 Zellen / ml Milch enthielt (Gruppe A). Zusätzlich wurden Proben von Tieren genommen, die auf einem bis drei Eutervierteln Zellzahlen deutlich über 100.000 Zellen / ml Milch und auf den übrigen Vierteln Zellzahlen unter 30.000 Zellen / ml Milch aufwiesen (Gruppe B). Die vorläufige Auswahl geeigneter Tiere erfolgte anhand der Milchleistungsprüfungsdaten (MLP-Daten) des Landeskontrollverbandes Niedersachsen – Bremen e.V. für die Betriebe Ruthe und Meldau der den Versuchen vorausgehenden Monate.

In diesem Versuch wurden Blut- und Milchproben von 6 Tieren aus Betrieb 1 und von 14 Tieren aus Betrieb 2 jeweils einmal untersucht. Da ein Tier nur auf drei Eutervierteln Milch gab, enthielt die Datenbank 20 Blut- und 79 Milchproben.

Die Laktationsnummern der Tiere sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Unter den untersuchten Tieren befand sich eines innerhalb der ersten 60 Laktationstage, alle anderen darüber.

Tabelle 10: Laktationsnummer der Versuchstiere aus Versuch 1

Laktationsnummer	Zahl der Tiere
1	6
2	6
3	4
4	3
5	1

Tabelle 11: Durchgeführte Untersuchungen in den Versuchen 1 und 2

<table>
<tr><th></th><th>Probenart</th><th>Untersuchung</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Milch</td><td>Viertelanfangsgemelk</td><td>elektrische Leitfähigkeit
Bakteriologie
Zytologie</td></tr>
<tr><td>Viertelhandgemelk
⇩
Zellsuspension</td><td>Mikroskopische Zelldifferenzierung
Vitalität
CL-Aktivität
Phagozytose</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Blut</td><td rowspan="2">EDTA-Blut
⇩
Zellsuspension</td><td>Leukozytenzahl (WBC)
Mikroskopische Zelldifferenzierung</td></tr>
<tr><td>Mikroskopische Zelldifferenzierung
Vitalität
CL-Aktivität
Phagozytose</td></tr>
</table>

Die durchgeführten Untersuchungen sind detailliert in Tabelle 11 dargestellt. Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität erfolgte anhand der in Abschnitt 3.6 beschriebenen Vorgehensweise, die der CL-Aktivität so wie in Abschnitt 3.7 erläutert.

3.9.3.2 Datengruppierung und statistische Auswertung

Die Tiere wurden nach dem in Tabelle 12 dargestellten Schema in Gruppen eingeteilt.

Tabelle 12: Datengruppierung in Versuch 1

Gruppe	n (Tiere)	SCC / ml Milch
A	5	< 30.000 in allen Vierteln
B	10	> 100.000 in 1 bis 3 Vierteln
C	5	> 100.000 in allen Vierteln

Die Auswertung des Datenmaterials wurde anhand von Tests auf Normalverteilung, Berechnung von Korrelationskoeffizienten, Student´s t-Tests und Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Tests vorgenommen. Die Daten von SCC im VAG, Max of well und CL-Aktivität / ml Milch wurden in logarithmierter Form in die Datenbank aufgenommen. Die Werte der Parameter MFI „n“ und „o“ wurden als Umkehrbruch (1/x) verwendet.

Die nicht normalverteilten Parameter PMN (Blut-Zellsuspension), eosinophile Granulozyten (Milch-Zellsuspension) und Epithelzellen (Milch-Zellsuspension) wurden nicht in statistische Berechnungen einbezogen. Da die Vitalität der Blut-Zellsuspension (nicht normalverteilt) immer über 98 % lag, und ihre Schwankungen – anders als in den Milch-Zellsuspensionen – lediglich labortechnische Ursachen hatte, wurden auch diese Werte in den Auswertungen nicht berücksichtigt. Der Ausdruck „Vitalität“ bezieht sich daher stets auf die Vitalität der Milch-Zellsuspensionen.

3.9.4 Versuch 2: Verlaufsuntersuchung

3.9.4.1 Tier- und Probenmaterial

Um die Zellfunktionalität in der Frühlaktation und im Verlauf einer Mastitis verfolgen zu können, wurden acht Tiere ab Woche 1 nach der Abkalbung etwa drei Monate lang in wöchentlichem Abstand beprobt. Vier der Tiere gehörten zu Betrieb 1, die anderen vier zu Betrieb 2. Zur Selektion geeigneter Tiere wurden wiederum die MLP-Daten herangezogen. Ausgewählt wurden Tiere, die in sich in der zweiten Laktation befanden und mehrere Monate vor dem Trockenstellen keine erhöhten Zellzahlen im Gesamtgemelk aufwiesen. Zwei Tiere waren Erstkalbinnen, sodass keine MLP-Daten vorlagen.

2 Tiere wurden 11 Mal, 2 Tiere 12 Mal und 4 Tiere 13 Mal untersucht. An jedem Termin wurden sowohl Blut- als auch Milchproben gewonnen.

An die Tiere wurden die Nummern 1 bis 8 vergeben. Die durchgeführten Untersuchungen waren die gleichen wie in Versuch 1 (s. Tabelle 11).

3.9.4.2 Datengruppierung und statistische Auswertung

Drei Tiere waren eutergesund und wurden in einer Gruppe zusammengefasst, die anderen Gruppen enthielt drei Tiere, die eine Mastitis entwickelten. Zwei Tiere mit latenten Infektionen wurden von einer Auswertung ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte nach den Tests auf Normalverteilung innerhalb der Gruppen von Woche zu Woche anhand von Mittelwerten und Standardabweichungen.

3.9.5 Versuch 3: Zusammenhang zwischen Kriterien der Zellfunktionalität und der Eutergesundheit, Betrachtung auf Tierebene

3.9.5.1 Tier- und Probenmaterial

Um einen Überblick über die Zellfunktionalität unter Berücksichtigung der Eutergesundheit zu erhalten, wurden insgesamt 36 Tiere ausgewählt, die entweder auf allen Vierteln gesund waren (SCC < 100.000 Zellen / ml Milch, Bakteriologie wurde nicht berücksichtigt), auf mindestens einem Viertel mittelgradig (SCC 100.000 – 400.000 Zellen / ml Milch) oder hochgradig (SCC > 400.000 Zellen / ml Milch) erkrankt waren. Die Selektion der Tiere erfolgte in Betrieb 1 anhand von Daten, die alle drei Wochen aus Viertelgemelksproben erhoben wurden. In Betrieb 2 wurde der zytobakteriologische Zustand möglicher Versuchstiere während einer Anamnesephase dreimal in wöchentlichem Abstand erfasst. In die Gruppe der eutergesunden Tiere wurden nur Tiere aufgenommen, die von der letzten Abkalbung bis zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Mastitis hatten. Aufgrund mangelnden Tiermaterials wurden in der Gruppe der hochgradig kranken Tiere auch solche Tiere berücksichtigt, deren Trächtigkeit nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnte.

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit wurden 10 Tiere der Versuchsgruppe dreimal an drei aufeinanderfolgenden Tagen und ein weiteres Mal in wöchentlichem Abstand untersucht.

Untersucht wurden jeweils Blut- und Milchproben. In die Versuchsgruppe wurden drei Tiere aufgenommen, die nur auf drei Eutervierteln laktierten. Die genauen Zahlen der untersuchten Milch- und Blutproben sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Um Missverständnisse zu vermeiden, werden im Weiteren die Proben, die von einem Tier an einem bestimmten Tag untersucht wurden, als „Tagesprobensatz“ bezeichnet. Ein Tagesprobensatz enthält somit bis zu vier Milchproben und eine Blutprobe desselben Tieres vom selben Tag. Aus dieser Untersuchung standen 69 Tagesprobensätze zur Auswertung zur Verfügung.

Tabelle 13: Allgemeines zum Probenumfang von Versuch 3			
Untersuchungen pro Tier	Tierzahl	Summe Blutproben	Summe Milchproben
1	25	24	97
2	1	2	8
3 oder mehr	10	41	168
gesamt	36	67	273

Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die Laktationsnummer der untersuchten Tiere und Tabelle 15 über die Laktationstage der Tiere. Aufgrund der Mehrfachuntersuchungen einzelner Tiere sind die Laktationstage nach den Tagesprobensätzen geordnet. Die durchgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 14: Laktationsnummer der Versuchstiere aus Versuch 3	
Laktationsnummer	Zahl der Tiere
1	15
2	9
3	5
4	6
7	1

Tabelle 15: Laktationstage der Versuchstiere aus Versuch 3, nach Tagesprobensätzen			
Tagesproben-sätze	Laktations-tage	Tagesproben-sätze	Laktations-tage
3	36 – 42	12	151 – 180
2	43 – 49	22	181 – 210
1	50 – 56	7	211 – 240
1	56 – 90	8	241 – 270
3	91 – 120	4	271 – 300
6	121 – 150	1	331 – 360

Tabelle 16: Durchgeführte Untersuchungen in Versuch 3		
	Probenart	Untersuchung
Milch	Viertelanfangsgemelk	elektrische Leitfähigkeit Bakteriologie Zytologie NAGase
	Viertelhandgemelk ⇩ Zellsuspension	Mikroskopische Zelldifferenzierung Vitalität CL-Aktivität
Blut	EDTA-Vollblutproben	Leukozytenzahl (WBC) Mikroskopische Zelldifferenzierung
	Blutplasma	NAGase
	Zellsuspension (aus EDTA-Blutproben)	NAGase Mikroskopische Zelldifferenzierung Vitalität CL-Aktivität

3.9.5.2 Datengruppierung und statistische Auswertung

Für die Auswertung des gesamten Datenumfanges wurden Tests auf Normalverteilung und Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Folgende Parameter waren erst nach Logarithmierung normalverteilt: elektrische Leitfähigkeit, SCC im VAG, NAGase VAG (Viertelanfangsgemelk), NAGase VGH (Viertelhandgemelk), Max und CL-Aktivität / ml Milch. Die nicht normal verteilten Parameter eosinophile Granulozyten (Zellsuspension Milch), Epithelzellen (Zellsuspension Milch) und Vitalität der Zellsuspension Blut wurden in den Auswertungen nicht berücksichtigt (s. auch Abschnitt 3.9.3.2).

Zur Beurteilung der Wiederholbarkeit der mehrfach untersuchten Tiere wurden einfaktorielle Varianzanalysen für wiederholte Untersuchungen und t-Tests für abhängige Stichproben berechnet.

Die für die Auswertung gebildeten Gruppen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Dabei wurden die Gruppen Kat1 bis Kat4 auf der Grundlage der Mastitiskategorisierung (HAMANN u. FEHLINGS 2002, s. Abschnitt 2.1.1) erstellt. Die statistischen Berechnungen erfolgten anhand von Student´s t-Tests für unabhängige Stichproben und einem Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test.

Tabelle 17: Datengruppierung in Versuch 3

Titel	Gruppe	n	Selektionskriterien	aus Gruppe
Gruppen auf Basis der Zellzahl		Tps*:	SCC / ml Milch	
	T1	24 (96 V)	< 100.000 in allen Vierteln	
	T2	21 (84 V)	100.000 – 400.000 in mind. 1 Viertel	
	T3	24 (93 V)	> 400.000 in mind. 1 Viertel	
Euterkranke Tiere		Viertel:	SCC / ml Milch	
	T1/<25	40	< 25.000	T1
	T2&3/<25	26	< 25.000	T2 & T3
	T2&3/>100	111	> 100.000	T2 & T3
	T2/100–400	43	100.000 – 400.000	T2
	T3/100–400	27	100.000 – 400.000	T3
	T3/>400	41	> 400.000	T3
Bakteriologischer Status und Zellfunktionalität		Tps*:	SCC / ml Milch (Bakteriologie)	
	Kat 1	18 (72 V)	≤ 100.000 (negativ)	
	Kat 2	8 (32 V)	≤ 100.000 (positiv) mind. 1 Viertel	
	Kat 3	9 (36 V)	> 100.000 (negativ) mind. 1 Viertel	
	Kat 4	33 (130 V)	> 100.000 (positiv) mind. 1 Viertel	
Gruppe Kat4 & SCC		Viertel:	SCC / ml Milch (Bakteriologie)	Kat4
	Kat4/<100	26	≤ 100.000 (negativ)	
	Kat4/>100	68	> 100.000 (positiv)	

n: Stichprobengröße (Tiere bzw. Viertel); Tps*: Tagesprobensätze; V: Viertel

3.9.6 Gesamtdatenbank: Zusammenhang zwischen Kriterien der Zellfunktionalität und der Eutergesundheit, Betrachtung auf Viertelebene

3.9.6.1 Datenmaterial

Für weitere Auswertungen wurden die vorhandenen Daten der Versuche 2 (s. Abschnitt 3.9.4) und 3 (s. Abschnitt 3.9.5) in einer gemeinsamen Datenbank zusammengefasst. Es wurde darauf geachtet, nur einen Datensatz der mehrfach untersuchten Kühe einzubringen, sodass 171 Milchproben von 43 Tieren ausgewertet werden konnten. Die Ergebnisse aus Blutproben wurden nicht berücksichtigt.

3.9.6.2 Datengruppierung und statistische Auswertung

Das vorliegende Datenmaterial wurde auf Normalverteilung und auf Korrelationen einzelner Parameter zueinander geprüft. Die Parameter elektrische Leitfähigkeit, SCC im VAG und Max waren normalverteilt, nachdem sie logarithmisch transformiert worden waren.

CL-Aktivität / ml Milch Die Parameter eosinophile Granulozyten (Zellsuspension Milch), Epithelzellen (Zellsuspension Milch) waren nicht normalverteilt und wurden nicht in statistische Berechnungen einbezogen (s. auch Abschnitt 3.9.3.2).

Die gebildeten Gruppen (s. Tabelle 18) wurden mittels Student´s t-Tests und einfaktoriellen Varianzanalysen für unabhängige Stichproben miteinander verglichen.

Tabelle 18: Datengruppierung der Gesamtdatenbank

Titel	Gruppe	n	Selektionskriterien	aus Gruppe
Gruppen auf Basis der Zellzahl		Viertel:	SCC / ml Milch	
	V1	77	< 50.000	
	V2	18	50.000 – 100.000	
	V3	22	> 100.000 – 200.000	
	V4	50	> 200.000	
Gruppen auf Basis der CL-Aktivität M		Viertel:	CL-Einh. / 1 Mio. PMN	
	CL1	54	< 3.000	
	CL2	44	3.000–6.000	
	CL3	70	> 6.000	
Gruppe CL2 & SCC		Viertel:	SCC / ml Milch	CL2
	CL2/$_{T<100}$	15	< 100.000 auf Tierebene	
	CL2/$_{V<100}$	10	< 100.000 auf Viertelebene	
	CL2/$_{V>100}$	14	≥ 100.000 auf Viertelebene	

n: Stichprobengröße

4. Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen der Eutergesundheit und der Funktionalität von aus Blut und Milch isolierten Leukozyten zu erkennen. Am Anfang standen Etablierung und Standardisierung der empfindlichen Untersuchungssysteme der Zellfunktionalität (s. Abschnitte 4.1 und 4.2). Dann wurden gezielt Versuchstiergruppen gebildet, mit denen bestimmte Fragestellungen bearbeitet wurden. In Versuch 1 wurde die Aktivität der Zellen aus Milch auf Abhängigkeit von der Zellfunktionalität der PMN aus Blut überprüft (s. Abschnitt 4.3). In einer Verlaufsuntersuchung (Versuch 2, Abschnitt 4.4) wurde die Entwicklung der Zellfunktionalität von einzelnen Tieren in den ersten drei Laktationsmonaten verfolgt. In einem abschließenden Versuch 3 und anhand einer Gesamtdatenbank wurde die Eutergesundheit mit zytologischen Methoden bestimmt und mit den neueren funktionellen Parametern verglichen (Abschnitte 4.5 und 4.6).

4.1 Methodische Versuche zur Phagozytoseaktivität in Blut

Da es weder für die Messung der Phagozytoseaktivität noch für die Bestimmung der Chemilumineszenz im Luminometer allseits anerkannte Arbeitsvorschriften gab, die sich an aus Milch isolierten Zellen anwenden lassen, war es notwendig, vorhandene Anweisungen zu überprüfen und zu modifizieren. Das in den Versuchen 1 bis 3 angewandte Vorgehen ist in Abschnitt 3.6 beschrieben, die Unterschiede zur Arbeitsanweisung der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover sind in Abschnitt 5.1.4 tabellarisch dargestellt.

4.1.1 Inkubationszeit

Wie in Abschnitt 3.9.1.1 beschrieben, wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf das Ergebnis der Phagozytosemessung untersucht.

Der Anteil phagozytierender Zellen (% n bzw. % o) stieg mit längerer Inkubationszeit an. Die Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), mit der die Zahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle abgeschätzt werden kann, zeigte für die Proben „o“ (opsonisiert mit Serum) mit steigender Inkubationszeit ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg, für die Proben „n“ (nicht opsonisiert) lagen die Werte für 30 und 60 Minuten auf ähnlichem Niveau (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Vergleich der Phagozytoseaktivität von Blut-PMN mit verschiedenen Inkubationszeiten

Inkubation in Minuten		30		60		90	
Tier	Probe	%	MFI	%	MFI	%	MFI
A	n	8,3	15,7	10,3	14,6	18,6	55,8
A	o	24,0	90,1	52,2	95,3	79,8	226,5
B	n	20,6	10,2	19,9	8,9	25,8	16,1
B	o	29,7	36,4	46,1	47,3	68,3	76,5

%: Anteil phagozytierender PMN;
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;
n: nicht opsonisierte Proben;
o: opsonisierte Proben

4.1.2 Zellkonzentration

Bezüglich der Phagozytosemessung mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen (s. Abschnitt 3.9.1.2) war in den Proben „n“ der Anteil phagozytierender Zellen höher, je niedriger die Zellzahl war. Der Anteil aktiver Zellen der Proben „o“ sank für Tier A mit der Zellkonzentration ab und blieb für Tier B in allen Ansätzen etwa gleich. Mit

200.000 Zellen / ml in der Probe (Ansatz c) war der Unterschied zwischen den opsonisierten (o) und den nicht opsonisierten Proben (n) geringer als in den Ansätzen a und b (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Vergleich der Phagozytoseaktivität in Blut-PMN mit verschiedenen Zellkonzentrationen in der Probe

Zellen / ml		4 Mio. (a)		2 Mio. (b)		200.000 (c)	
Tier	Probe	%	MFI	%	MFI	%	MFI
A	n	10,3	14,6	11,3	19,9	29,4	66,1
A	o	52,2	95,3	42,8	96,2	32,4	99,1
B	n	24,1	8,92	30,3	11,0	39,4	31,8
B	o	46,7	52,4	47,4	64,0	45,0	56,4

%: Anteil phagozytierender PMN;
MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;
n: nicht opsonisierte Proben;
o: opsonisierte Proben

4.1.3 Bakterienkonzentration

Um die geeignete Zahl der Bakterien zu eruieren, wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen gemessen (s. Abschnitt 3.9.1.3).

Mit steigender Bakterienkonzentration stiegen sowohl der Prozentsatz aktiver Zellen als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (s. Tabelle 21). Bezogen auf den Anteil phagozytierender Zellen war der Unterschied zwischen den Proben „n“ und „o“ in den Proben mit der höheren Bakterienkonzentration größer.

Tabelle 21: Vergleich der Phagozytoseaktivität in Blut-PMN mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen in der Probe					
Bakterienkonz.		0,15 x 10^8/ml		0,7 x 10^8/ml	
Tier	Probe	%	MFI	%	MFI
A	n	6,2	8,3	11,1	19,9
B	n	18,4	4,3	30,3	11,0
A	o	15,0	34,9	42,8	96,2
B	o	19,2	9,3	47,4	64,0

%: Anteil phagozytierender PMN;

MFI: mittlere Fluoreszenzintensität;

n: nicht opsonisierte Proben;

o: opsonisierte Proben

4.2 Methodische Versuche zur CL-Aktivität in Blut

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss einzelner Parameter auf die CL-Aktivität überprüft. Für die Versuche 1 bis 3 wurde die Messung unter den optimalen Bedingungen durchgeführt (s. Abschnitt 3.7). In Tabelle 79 (s. Abschnitt 5.2.9) werden die eigenen Ergebnisse den Angaben von MEHRZAD (2002) gegenübergestellt.

4.2.1 Zellisolierung bei verschiedenen Temperaturen

Nach der Isolation der Blutzellen bei 0° C und bei 25° C (s. Abschnitt 3.9.2.1) wurden die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich ihrer CL-Aktivität untersucht.

Die CL-Aktivität / 1 Million PMN der Blutproben der Tiere 1, 2 und 4 war in Gruppe 2 (25° C) regelmäßig niedriger als in Gruppe 1 (0° C). Tier 3 wies jedoch stets in Gruppe 1 die geringeren Werte auf.

Der Varianzkoeffizient aller Proben pro Gruppe (jeweils n = 8) betrug zwischen den Proben aus Gruppe 1 24,8 %, der zwischen den Proben aus Gruppe 2 33,0 % (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Mittelwerte (X), Standardabweichungen (sd) und Variationskoeffizienten (VK) der Gruppen 1 und 2 (Versuch Zellisolation)

	Gruppe 1 (0° C)	Gruppe 2 (25° C)
X	2.098	2.001
± sd	520,5	659,6
VK	24,8	33,0

Stichprobengröße n = 8;

dargestellt sind CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

Die Ergebnisse der Vitalitätsmessung im Durchflusszytometer (s. Abschnitt 3.5.8) ließen im FSC/SSC-Dot Plot erkennen, dass in den Proben aus Gruppe 2 mehr Zellaggregate vorhanden waren als in den Proben aus Gruppe 1.

4.2.2 Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Nach der Isolierung der PMN wurde jeweils ein Teil der Zellsuspension ca. 1 Stunde bei 0° C (Ansatz 1), 25° C (Ansatz 2) bzw. 38° C (Ansatz 3) inkubiert (s. Abschnitt 3.9.2.2). Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Höhe der CL-Aktivität wurde untersucht. Das Probenschema ist der Tabelle 23 zu entnehmen.

Von allen durchgeführten Messungen wurden die CL-Einheiten / 1 Mio. PMN berechnet.

Tabelle 23: Probenschema für den Versuch zur Inkubation mit verschiedenen Temperaturen

Tier	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3
2	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3
3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3
4	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3	Ansatz 1 Ansatz 2 Ansatz 3

Für jedes Tier wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient aus den Ergebnissen von Ansatz 1 (Tag 1) bis Ansatz 1 (Tag 5) gebildet. Entsprechend wurde mit den Ansätzen 2 und 3 verfahren. Der niedrigste mittlere Variationskoeffizient lag in Ansatz 1 (s. Tabelle 24).

Der erste Messwert der 30 Einzelwerte, die während der Chemilumineszenzmessung erhoben werden (s. 3.7.7), lag in den Ansätzen 3 häufig über 0.

Tabelle 24: Mittelwerte (X), Standardabweichungen (sd) und Variationskoeffizienten (VK) der Ansätze 1 bis 3, nach Tieren getrennt (Versuch zur Inkubation)

Tier		Ansatz 1 (0° C)	Ansatz 2 (25° C)	Ansatz 3 (38° C)
1	X	1.711	1.679	1.520
	± sd	500	622	362
	VK	29,2	37,1	23,8
2	X	1.430	1.448	1.619
	± sd	279	360	539
	VK	19,5	24,9	33,3
3	X	2.033	2.139	2.716
	± sd	552	541	1.430
	VK	27,1	25,3	52,6
4	X	2.963	2.934	2.612
	± sd	946	1.598	939
	VK	31,9	54,5	36,0
mittlerer VK		26,9	35,5	36,4

dargestellt sind die CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

4.2.3 Lagerungsdauer der Proben

Nach mehrmaliger Messung der selben Proben innerhalb von 24 Stunden wurde für die Tiere 3 und 4 ein kontinuierlicher Abfall von Vitalität und CL-Aktivität beobachtet (s. Abbildung 6). Für die Tiere 1 und 2 wies die CL-Aktivität ein Maximum nach 6 Stunden auf und fiel danach ab. Insgesamt blieben die CL-Aktivitäten der Tiere 1 und 2 höher als die der beiden anderen Tiere. Bei der ersten Messung lagen die Ergebnisse der CL-Bestimmung der gesunden Tiere 3 und 4 jedoch nicht niedriger als die der kranken Tiere 1 und 2.

Tabelle 25 gibt die Werte der CL-Aktivität und der Vitalität zu allen Messzeitpunkten wieder.

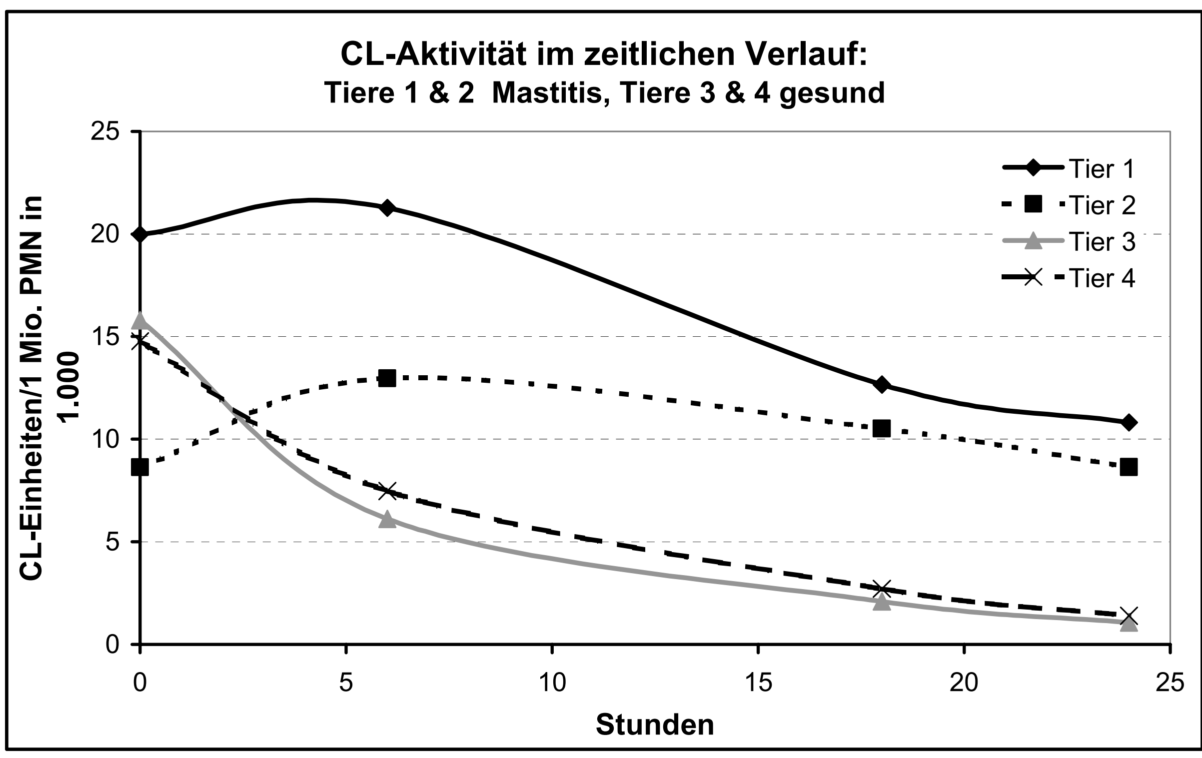


Abbildung 6: CL-Aktivität im zeitlichen Verlauf aus Blutproben von 4 Tieren

Tabelle 25: Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die CL-Aktivität und die Vitalität von 4 Blutproben

Inkubation in Stunden		0	6	18	24
Tier 1	CL	11.985	8.629	15.796	14.776
	Vit.	98,2	97,3	97,0	93,6
Tier 2	CL	21.267	12.971	6.117	7.475
	Vit.	97,3	98,8	96,7	93,6
Tier 3	CL	12.663	10.519	2.099	2.709
	Vit.	97,2	98,6	92,5	93,0
Tier 4	CL	10.817	8.641	1.069	1.400
	Vit.	95,3	96,9	79,1	79,4

CL: CL-Aktivität / 1 Mio. PMN

Vit.: Vitalität in %

4.2.4 Zellkonzentration

Die Abhängigkeit der CL-Aktivität von der Zahl der Zellen in der Probe wurde untersucht (s. Abschnitt 3.9.2.4). Jeder der drei Ansätze bestand aus 16 Stichproben.

Die CL-Aktivität entwickelte sich etwa parallel zur Zellkonzentration in der Messlösung (s. Abbildung 7). Die Korrelation zwischen der CL-Aktivität (unbereinigt) und der Anzahl vitaler PMN in 50 µl Arbeitslösung betrug, je nach Tier und Versuchstag, 0,97 bis 0,99.

Tabelle 26 gibt die CL-Aktivitäten eines Versuchstages von allen vier Tieren in Abhängigkeit von der Zellkonzentration wieder. Die Ergebnisse dieses Versuchstages sind als CL-Aktivität (unbereinigt) in Abbildung 7 noch einmal graphisch dargestellt und zeigen in drei von vier Tieren einen linearen Anstieg der CL-Aktivität mit steigender Zellzahl.

Tabelle 26: CL-Aktivität unter Berücksichtigung verschiedener Zellkonzentrationen an Versuchstag 1

Tier	Ansatz	Zellkonzentration in 10^3 / ml	vitale PMN / 50 µl	CL-Aktivität (unbereinigt)	CL-Einheiten / 1 Mio. PMN
1	a	1,450	58.500	148,3	2.162
	b	2,175	87.751	245,7	2.389
	c	4,350	175.502	372,0	1.809
2	a	1,330	57.346	116,9	1.838
	b	2,000	86.234	159,2	1.666
	c	4,000	172.469	271,6	1.422
3	a	1,283	42.128	93,2	1.943
	b	1,952	63.209	120,5	1.676
	c	3,850	126.419	194,0	1.350
4	a	1,267	50.871	173,7	2.642
	b	1,900	76.286	233,5	2.369
	c	3,800	152.573	378,8	1.922

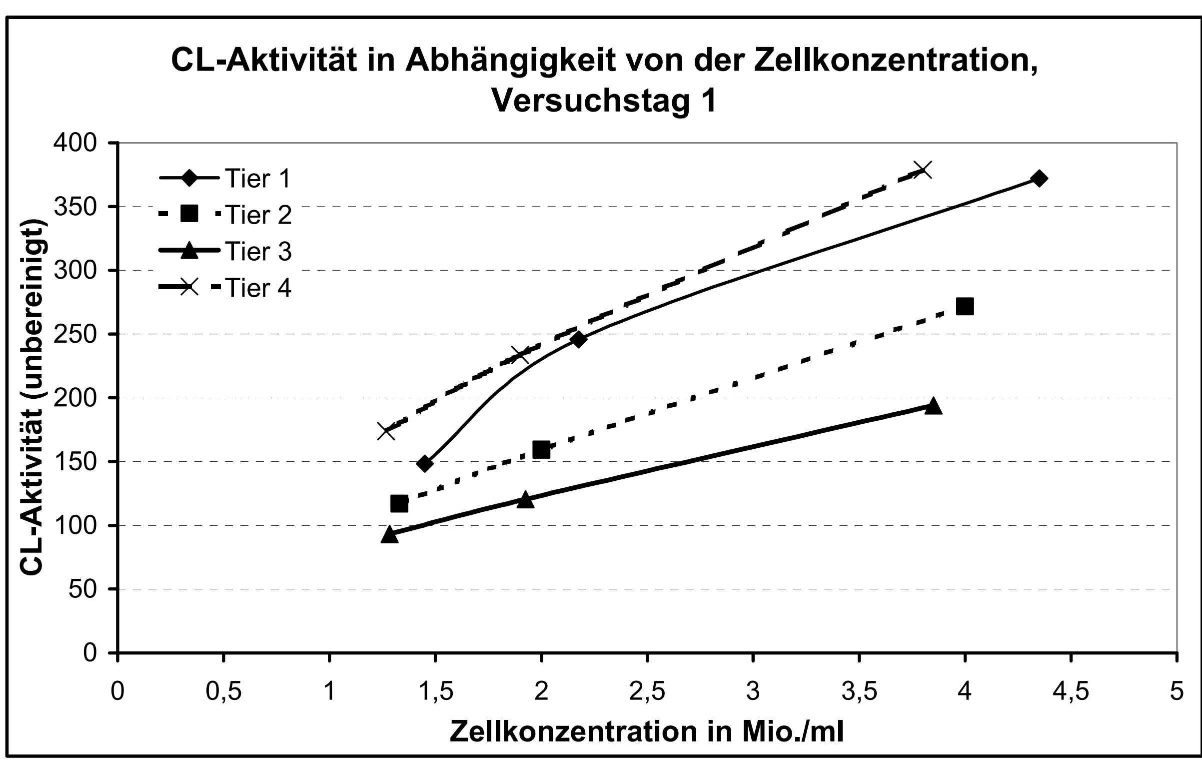


Abbildung 7: CL-Aktivität (unbereinigt) in Abhängigkeit von der Zellkonzentration, Versuchstag 1

4.2.5 PMA-Konzentration

Mit dieser Untersuchung wurde die Frage verfolgt, welche PMA-Konzentration für die Bestimmung der CL-Aktivität geeignet ist (s. Abschnitt 3.9.2.5). Dafür wurden drei Reaktionslösungen mit jeweils verschiedenen PMA-Konzentrationen zur Messung der CL-Aktivität eingesetzt.

Für jede Reaktionslösung (RL) lagen Daten von vier Tieren und je drei Versuchstagen vor. Insgesamt bestand daher die Stichprobengröße je Reaktionslösung aus 12 Datensätzen.

In 7 von 12 Probensätzen bestand zwischen der Konzentration des PMA und der CL-Aktivität / 1 Mio. PMN eine positive Korrelation größer als 0,78.

Aus allen Proben mit RL 1 (375 ng PMA / ml, n = 12) wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient gebildet. Ebenso wurden die RL 2 (750 ng PMA / ml) und 3 (1.500 ng PMA / ml) ausgewertet. Der Variationskoeffizient betrug für RL 1 35,7 %, für RL 2 22,2 % und für RL 3 32,0 % (s. Tabelle 27).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse des dritten Versuchstages befindet sich in Abbildung 8.

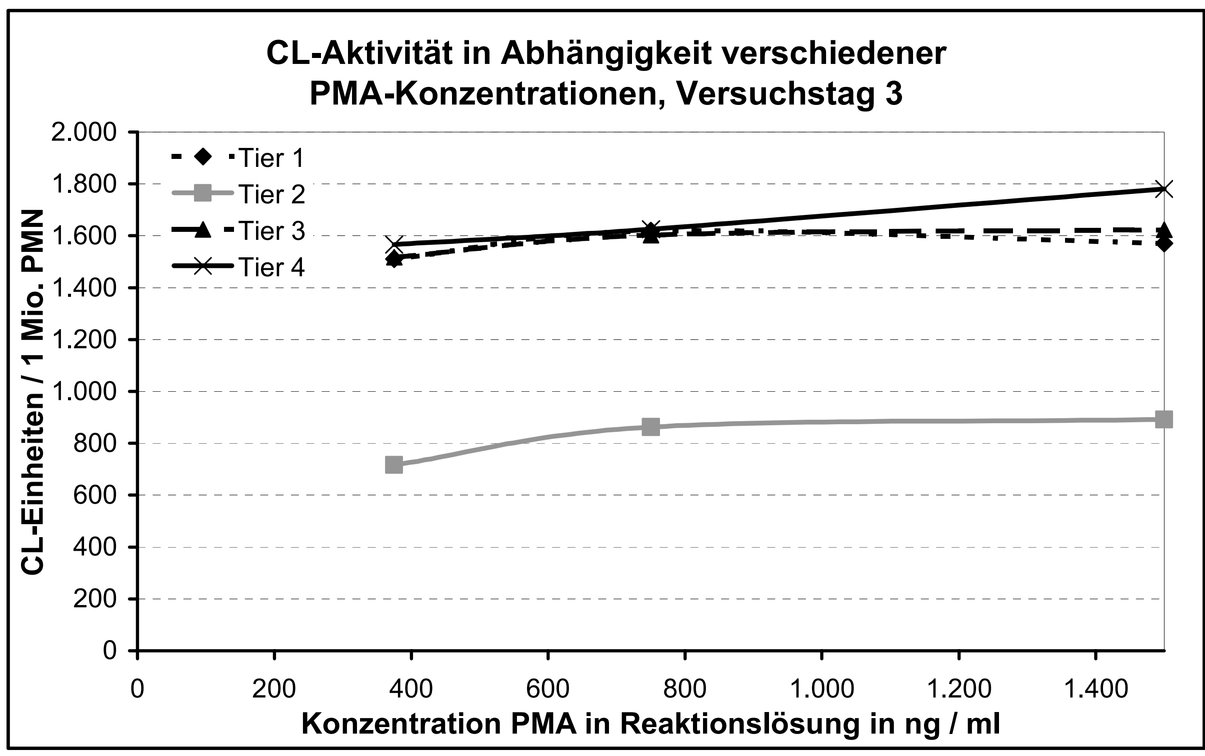


Abbildung 8: Vergleich verschiedener PMA-Konzentrationen anhand der CL-Aktivität, Versuchstag 3

Tabelle 27: Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der CL-Aktivität / 1 Mio. PMN, gemessen mit drei verschiedenen PMA-Konzentrationen RL1, RL2 und RL3

PMA-Konzentration	RL 1 (375 ng / ml)	RL 2 (750 ng / ml)	RL 3 (1.500 ng / ml)
Mittelwert	411,9	496,0	475,0
Standardabweichung	147,2	110,3	151,9
Variationskoeffizient	35,7	22,2	32,0

n = 8 pro RL;

dargestellt sind CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

4.2.6 pH-Wert

Um den Einfluss des pH-Wertes in der Reaktionslösung (RL) auf die Messung der CL-Aktivität einordnen zu können, wurden die Proben von vier Tieren an drei Versuchstagen mit unterschiedlichen pH-Werten gemessen (s. Abschnitt 3.9.2.6).

Aus allen gemessenen Proben wurden die mit RL 1 und die mit RL 2 in Gruppen zusammengefasst. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der beiden Gruppen sind der Tabelle 28 zu entnehmen.

Der Vergleich der Ergebnisse der Versuchstage 1 bis 3, getrennt nach Tier und pH-Wert, ergab für den pH-Wert von 7,1 höhere Varianzen als für den pH-Wert von 10,8 (s. Tabelle 29).

Tabelle 28: CL-Einheiten / 1 Mio. PMN der Gruppen RL 1 (pH = 10,8) und RL 2 (pH = 7,1)

	pH 10,8	pH 7,1
Stichproben	n = 12	n = 12
Mittelwert	2.748	272
Standard-abweichung	927,5	89,7
VK	33,7	33,0

Tabelle 29: Variationskoeffizienten (VK in %) aus den CL-Aktivitäten zwischen den Versuchstagen 1 – 3

Tier	pH 10,8	pH 7,1
1	9,6	33,0
2	21,0	24,3
3	18,2	28,6
4	28,8	50,4

dargestellt sind CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

4.2.7 Messung der CL-Aktivität aus Vollblut, lysiertem Blut und aufbereiteter Zellsuspension

Mit dieser Untersuchung sollte gestestet werden, ob die Messung der CL-Aktivität auch ohne die zeitaufwändige Zellisolierung möglich ist (s. Abschnitt 3.9.2.7). Gemessen wurden drei Arten von Proben: Vollblutproben (a), lysierte Proben (b) und isolierte PMN (c).

Aus den Proben a konnte im Luminometer keine CL-Aktivität erfasst werden. Die Ergebnisse in CL-Einheiten / 1 Million PMN der beiden anderen Probenarten sind beispielhaft für Versuchstag 1 in Tabelle 30 dargestellt. Die Werte der isolierten PMN lagen etwas höher.

Der Korrelationskoeffizient zwischen der Gruppe b und der Gruppe c (n = 12 in jeder Gruppe) betrug, wenn jeweils alle Tiere und alle Tage zusammengefasst wurden, 0,96.

Tabelle 30: CL-Aktivität / 1 Mio. PMN von 4 Tieren an einem Versuchstag aus isolierten PMN und lysierten Blutproben

	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4
isolierte PMN	4.705	3.722	8.012	8.243
lysiertes Blut	3.579	3.142	7.184	7.269

dargestellt sind CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

4.2.8 Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages

Ziel der Untersuchungen war es, die Wiederholbarkeit der CL-Aktivitätsbestimmung zu überprüfen.

In diesem Versuch wurde zwischen Proben und Arbeitslösungen unterschieden (s. Abschnitt 3.9.2.8). An vier Tagen wurden von jedem Tier zwei Proben getrennt aufbereitet (Proben 1 und 2). Von jeder Probe wurden wiederum je zwei Arbeitslösungen hergestellt (Arbeitslösungen 1a, 1b, 2a und 2b).

Für die Auswertung wurde der Parameter CL-Einheiten / 1 Million PMN verwendet. Aus den beiden Arbeitslösungen jeder Probe wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 0,2 und 14,2 %, im Mittel bei 4,7 %.

Ebenfalls wurden für jeden Tag aus den vier Proben 1a, 1b, 2a und 2b eines Tieres die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten erhoben, die Variationskoeffizienten betrugen in diesem Fall zwischen 5,2 und 24,1 %, im Schnitt 10,5 % (s. Tabelle 31).

Tabelle 31: Mittelwerte (X), Standardabweichungen (sd) und Variationskoeffizienten (VK) der vier Ansätze pro Tier für die Tage 1 bis 4 (Versuch zur Wiederholbarkeit)

Tier		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	X	2.495	1.963	3.654	2.496
	± sd	275	103	436	275,
	VK	11,0	5,2	11,9	11,0
2	X	5.227	2.128	2.635	5.228
	± sd	303	193	634	303
	VK	5,8	9,1	24,1	5,8
mittlerer VK		10,5			

dargestellt sind CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

4.3 Versuch 1: Einfluss der Zahl der erkrankten Euterviertel pro Kuh auf die Zellfunktionalität von PMN aus Milch und Blut

Ziel der Untersuchungen war es, die Aktivität der aus Blut gewonnenen Zellen hinsichtlich der Eutergesundheit einzuordnen. Außerdem sollten gezielt Tiere untersucht werden, die auf allen vier Eutervierteln erkrankt waren, und mit gesunden Tieren verglichen werden. Hierfür wurden Milch- und Blutproben von 20 Tieren aus den beiden Betrieben untersucht (s. Abschnitt 3.9.3). Neben der zytobakteriologischen Untersuchung wurde besonderes Augenmerk auf die Zelldifferenzierung und die funktionellen Parameter Chemilumineszenz und Phagozytose gerichtet.

Auf der Grundlage der Zellzahl im VAG wurden drei Gruppen gebildet (s. Abschnitt 4.3.1), und diese untereinander verglichen. Die Ergebnisse für die Blutwerte sind in Abschnitt 4.3.2 und die für die Milchwerte in Abschnitt 4.3.3 dargestellt.

4.3.1 Gruppen auf Basis der Zellzahl im VAG

Aus den vorhandenen Datensätzen wurde die in Abbildung 9 dargestellte Gruppeneinteilung vorgenommen.

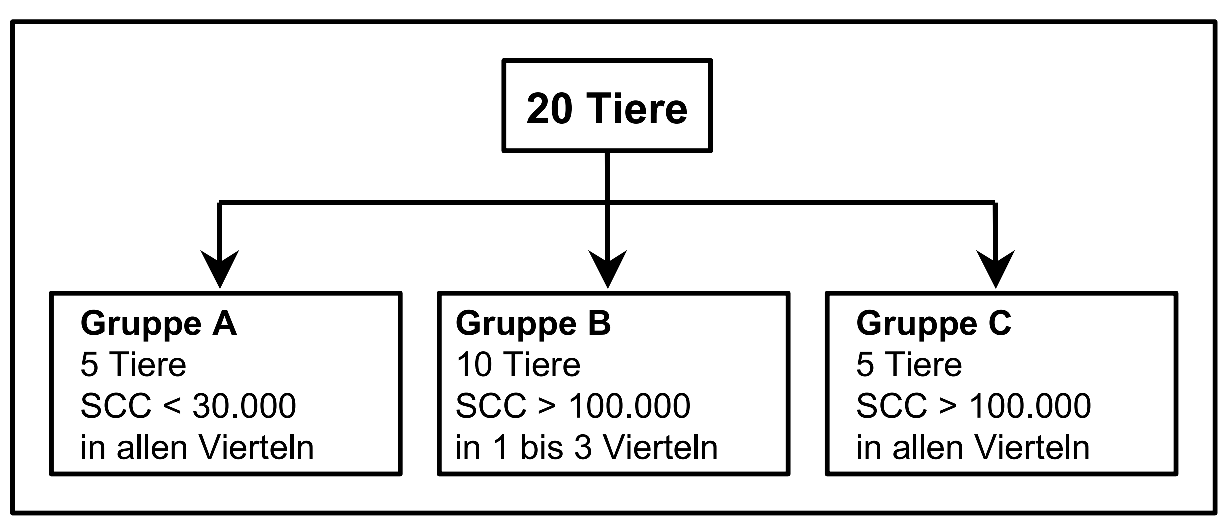


Abbildung 9: Gruppeneinteilung in Versuch 1; SCC: Anzahl somatischer Zellen / ml VAG

4.3.2 Blutproben

4.3.2.1 Korrelationen

4.3.2.1.1 Vollblutuntersuchungen

Tabelle 32 gibt Korrelationen zwischen dem Anteil PMN im Blutausstrich und verschiedenen Parametern wieder.

Korrelationen zum Anteil PMN im Zelldifferentialbild aus Vollblut bestanden für die jeweiligen Anteile eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten, für WBC und Time.

Tabelle 32: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Blutproben zum Anteil PMN in Blut (n = 20)

Parameter	k
WBC	0,64
eosinophile Granulozyten B	-0,38
Lymphozyten B	-0,94
% n	-0,23
MFI n	-0,07
% o	-0,13
MFI o	-0,05
CL-Aktivität B	0,06
log Max	0,08
Time	-0,50

n: Stichprobengröße (Tiere)

4.3.2.1.2 Zellfunktionalität in Blut

In Tabelle 33 werden die Korrelationskoeffizienten der Parameter aus Blutproben untereinander dargestellt.

Tabelle 33: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter der Zellfunktionalität von aus Blut isolierten Zellen zueinander (n = 20)

Parameter 1	Parameter 2	k
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log Max	0,81
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	Time	-0,12
log Max	Time	0,07
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	% n	0,22
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	MFI n	-0,26
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	% o	-0,03
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	MFI o	0,28

n: Stichprobengröße (Tiere)

Für die funktionellen Parameter aus Blut lag eine Korrelation zwischen der CL-Aktivität / 1 Mio. PMN und log Max vor.

4.3.2.2 Gruppenvergleich

Tabelle 34 gibt die Werte der Untersuchungen aus Blutproben wieder. Die Signifikanzen zwischen diesen Gruppen sind in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 34: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) von aus Blut gewonnenen Daten der Gruppen A, B und C

Gruppe		WBC	PMN	Eos	Lym	% n	1 / MFI n
A	X	6,9	42,6	2,6	53,4	37,6	0,15
	sd	2,1	10,6	0,9	10,2	23,9	0,09
	n	5	5	5	5	5	5
B	X	8,4	47,5	7,1	44,0	42,3	0,20
	sd	1,4	16,0	5,0	13,2	17,5	0,05
	n	10	10	10	10	10	10
C	X	9,7	54,6	9,6	34,2	32,9	0,21
	sd	3	16,5	5,3	11,7	12,3	0,02
	n	5	5	5	5	5	5

Gruppe		% o	1 / MFI o	CL-Aktivität B	log Max	Time
A	X	40,4	0,01	15.499	0,21	1.449
	sd	18,8	0,01	5.330	0,22	297
	n	5	5	5	5	5
B	X	45,1	0,02	11.008	0,14	1.481
	sd	12,7	0,02	4.639	0,24	367
	n	10	10	10	10	10
C	X	39,0	0,02	11.336	0,17	1.477
	sd	15,6	0,02	4.799	0,15	424
	n	5	5	5	5	5

n = Stichprobengröße (Tiere)

Tabelle 35: Signifikanzen von aus Blutproben gewonnenen Daten zwischen den Gruppen A bis C

Gruppen		WBC	PMN	Eos	Lym M	% n	1 / MFI n
A	B	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.
A	C	n. s.	n. s.	*	*	n. s.	n. s.
B	C	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Allgemein		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Gruppen		**% o**	**1 / MFI o**	**CL-Aktivität B**	**log Max**	**Time**	
A	B	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	
A	C	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	
B	C	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	
Allgemein		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	

n. s.: nicht signifikant, p ≥ 0,05; *: p < 0,05;
**: p < 0,01; ***: p < 0,001

4.3.2.2.1 Vollblutuntersuchungen

Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) waren nur für die Anteile eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten zu ermitteln. Dennoch lagen in Gruppe C die Werte von WBC (9,7 Mio. / ml) und der Anteil PMN (54,6 %) höher als in den beiden anderen Gruppen.

4.3.2.2.2 Zellfunktionalität in Blut

Die größten Anteile phagozytierender Zellen hatte die Gruppe B sowohl in den nicht opsonisierten (42,3 %) als auch in den opsonisierten Proben (45,1 %). Die Gruppe A wies für die Parameter CL-Aktivität B (15.499 Einheiten / 1 Mio. PMN) sowie log Max (0,21) die höchsten Werte auf.

4.3.3 Milchproben

4.3.3.1 Korrelationen

4.3.3.1.1 Eutergesundheit

In Tabelle 36 sind die Korrelationskoeffizienten verschiedener Parameter zur Zellzahl im VAG aufgeführt.

Tabelle 36: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Milchproben zu log SCC (n = 79)

Parameter	k
elektrische Leitfähigkeit	0,65
PMN M	0,59
Lymphozyten M	-0,61
Makrophagen M	-0,35
% n	-0,37
MFI n	-0,05
% o	-0,68
MFI o	-0,68
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN M	0,39
log Max	0,65
Time	-0,57
log CL-Aktivität / ml Milch	0,89

n: Stichprobengröße (Viertel)

Die Zellzahl korrelierte mit der elektrischen Leitfähigkeit, den Anteilen PMN, Lymphozyten und Makrophagen aus dem mikroskopischen Zelldifferentialbild und mit den Parametern der CL-Aktivität. Bezüglich der Phagozytose zeigten besonders die Daten der opsonisierten Proben Korrelationen zur Zahl somatischer Zellen.

4.3.3.1.2 Zelldifferentialbild in Milch

In Tabelle 37 sind die Korrelationen verschiedener Parameter aus Milchproben zum Anteil PMN in Milch dargestellt.

Tabelle 37: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Milchproben zum Anteil PMN in Milch (n = 79)

Parameter	k
Lymphozyten M	-0,83
Makrophagen M	-0,77
% n	-0,49
MFI n	-0,13
% o	-0,57
MFI o	-0,84
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN M	0,48
log Max	0,85
Time	-0,56
log CL-Aktivität / ml Milch	0,80

n: Stichprobengröße (Viertel)

Der Anteil PMN in der Milchzellsuspension zeigte hohe Korrelationen zu den entsprechenden Anteilen Lymphozyten und Makrophagen, aber auch zu den funktionelle Parametern.

4.3.3.1.3 Zellfunktionalität in Milch

Tabelle 38 führt die Korrelationskoeffizienten verschiedener Parameter der Zellfunktionalität aus Milchzellen auf.

Tabelle 38: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter der Zellfunktionalität von aus Milch isolierten Zellen zueinander (n = 79)		
Parameter 1	Parameter 2	k
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log Max	0,76
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	Time	-0,23
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log CL-Aktivität / ml Milch	0,66
log Max	Time	-0,60
log Max	log CL-Aktivität / ml Milch	0,88
Time	log CL-Aktivität / ml Milch	-0,62
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	% n	-0,14
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	MFI n	-0,06
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	% o	-0,39
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	MFI o	-0,54

n: Stichprobengröße (Viertel)

Unter den Werten der Phagozytosemessung korrelierten nur die Daten der opsonisierten Proben mit der CL-Aktivität. Die Parameter der CL-Aktivität zeigten, abgesehen von der CL-Aktivität / 1 Mio. PMN zum Parameter Time, untereinander deutliche Korrelationen.

4.3.3.2 Gruppenvergleich

Für die statistischen Auswertungen wurde aus den vier Vierteln eines Tieres jeweils der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der t-Tests und Varianzanalysen erfolgte dann anhand dieser Mittelwerte. Aus diesem Grund hat die Gruppe A bspw. eine Stichprobenzahl n = 5.

Die Grunddaten der Gruppen A bis C sind der Tabelle 39 zu entnehmen. Signifikanzen zwischen den Gruppen sind in Tabelle 40 aufgeführt.

Tabelle 39: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) von aus Milchproben gewonnenen Daten der Gruppen A, B und C

Gruppe		log SCC	LF	PMN M	Lym M	Makro M	Vitalität	% n
A	X	4,22	5,43	41,9	27,7	25,5	66,9	49,6
	± sd	0,19	0,22	16,2	8,7	3,3	7,9	6,0
	n	5	5	5	5	5	5	5
B	X	5,00	6,06	65,2	12,2	21,0	79,3	32,9
	± sd	0,75	0,44	17,5	7,9	10,9	14,6	8,8
	n	10	10	10	10	10	10	10
C	X	5,90	6,62	83,9	2,8	13,2	80,4	35,7
	± sd	0,32	0,56	10,7	1,6	9,4	13,1	16,7
	n	5	5	5	5	5	5	5
Gruppe		**1 / MFI n**	**% o**	**1 / MFI o**	**CL-Aktivität M**	**log Max**	**Time**	**log Cl-Aktivität / ml Milch**
A	X	0,21	54,5	0,16	4.419	-1,43	2.017	1,14
	± sd	0,05	7,8	0,03	1.568	0,38	415	0,46
	n	5	5	5	5	5	5	5
B	X	0,22	43,5	0,09	6.615	-0,79	1.593	2,32
	± sd	0,06	10,4	0,03	4.369	0,45	267	0,65
	n	10	10	10	10	10	10	10
C	X	0,22	32,2	0,03	9.304	-0,33	1.425	3,62
	± sd	0,06	2,6	0,01	3.928	0,14	350	0,22
	n	5	5	5	5	5	5	5

n = Stichprobengröße (Tiere)

Tabelle 40: Signifikanzen von aus Milchproben gewonnenen Daten zwischen den Gruppen A bis C

Gruppen		log SCC	LF	PMN M	Lym M	Makro M	Vitalität	% n
A	B	***	*	*	**	n. s.	n. s.	**
A	C	***	**	**	**	*	n. s.	n. s.
B	C	***	n. s.	*	**	n. s.	n. s.	n. s.
Allgemein		***	**	**	***	n. s.	n. s.	*
Gruppen		1 / MFI n	% o	1 / MFI o	CL-Aktivität M	log Max	Time	log Cl-Aktivität / ml Milch
A	B	n. s.	n. s.	***	n. s.	*	*	**
A	C	n. s.	***	***	*	***	*	***
B	C	n. s.	**	**	n. s.	n. s.	n. s.	***
Allgemein		n. s.	**	***	n. s.	**	*	***

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0{,}05$; *: $p < 0{,}05$;
**: $p < 0{,}01$; ***: $p < 0{,}001$

4.3.3.2.1 Eutergesundheit

Mit der Zellzahl im VAG stiegen die Werte der elektrischen Leitfähigkeit an.

4.3.3.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Die Anteile der PMN und Lymphozyten in der Milchzellsuspension veränderten sich von Gruppe zu Gruppe signifikant (s. Tabelle 40). Dabei lag der Anteil PMN in Gruppe C am höchsten, der der Lymphozyten in Gruppe A.

4.3.3.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Phagozytoseaktivität der opsonisierten Proben zeigte deutlichere Unterschiede zwischen den Gruppen als die der nicht opsonisierten. In den opsonisierten Proben

sank der Prozentsatz aktiver Zellen ebenso wie der Wert 1 / MFI von Gruppe A bis Gruppe C signifikant ab ($p < 0,01$).

Hinsichtlich der CL-Aktivität wurde ein Anstieg der Werte von Gruppe A zu Gruppe C festgestellt, der jedoch nur für den Vergleich von Gruppe A mit Gruppe C statistisch signifikant war. Die CL-Aktivität / ml Milch stieg von Gruppe zu Gruppe signifikant an ($p < 0,01$).

4.4 Versuch 2: Verlaufsuntersuchung

Die Tiere 1 bis 8 wurden von der Abkalbung an in wöchentlichem Abstand zwischen elf und 13 Mal untersucht. Auf diese Weise wurden Informationen über den Gesundheitszustand der Kühe über die ersten drei Monate der Laktation gesammelt.

Die Tiere, die im gesamten Zeitraum der Untersuchung eutergesund waren, wurden in einer Gruppe zusammengefasst und hinsichtlich des Laktationsstadiums ausgewertet (Abschnitt 4.4.1).

Drei Tiere entwickelten im Verlauf der Untersuchung eine Mastitis. Die Datensätze aus den Untersuchungswochen vor, während und nach der Euterentzündung wurden miteinander verglichen. Dabei wurden sowohl die betroffenen Euterviertel als auch die nicht betroffenen Viertel derselben Tiere in die Bewertungen einbezogen (Abschnitt 4.4.2).

Zwei Tiere hatten eine latente Infektion mit *S. aureus* und wurden in der Auswertung der Daten nicht berücksichtigt.

4.4.1 Eutergesunde Tiere

Drei Tiere blieben während des gesamten Untersuchungszeitraumes eutergesund. Die Daten dieser Tiere wurden in Laktationswochen eingeteilt und von Woche zu Woche miteinander verglichen. Dadurch ergab sich eine Datengruppierung nach dem in Tabelle 41 dargestellten Schema.

4.4.1.1 Zellzahl im VAG

Die durchschnittlichen Zellzahlen der Gruppen W1 bis W14 sind in Abbildung 10 graphisch dargestellt. In den Wochen W1 bis W3 lag log SCC jeweils über 4,4, in den übrigen Wochen befanden sich die Werte zwischen 3,5 und 4,2.

Tabelle 41: Einteilung der Daten der gesunden Tiere nach Laktationswochen (W)					
Woche	Laktations-tage	n	Woche	Laktations-tage	n
W1	1 – 7	12	W8	50 – 56	12
W2	8 – 14	8	W9	57 – 63	12
W3	15 – 21	8	W10	64 – 70	12
W4	22 – 28	12	W11	71 – 77	12
W5	29 – 35	12	W12	78 – 84	12
W6	36 – 42	8	W13	85 – 91	12
W7	43 – 49	12	W14	92 – 98	12

n: Stichprobengröße (Viertel)

4.4.1.2 Zelldifferentialbild in Milch

Das Zelldifferentialbild der Milch-Zellsuspensionen (s. Abbildung 11) wurde in den Wochen W2, W8 und W14 von PMN dominiert. In den übrigen Wochen waren die Lymphozyten die stärkste Zellfraktion.

4.4.1.3 Zellfunktionalität in Blut und Milch

Die Werte der opsonisierten Proben o lagen stets über denen der nicht opsonisierten Proben n (s. Abbildung 12). Für alle Parameter ließ sich ein Peak in Woche W2 feststellen.

In Abbildung 13 sind die CL-Einheiten / 1 Mio. PMN der Zellen aus Blut und aus Milch nach Wochen aufgeführt. Die Werte der PMN aus Blut waren höher als die der PMN aus Milch. Maxima lagen in Woche W2 sowie in den Wochen W11 und W12 vor.

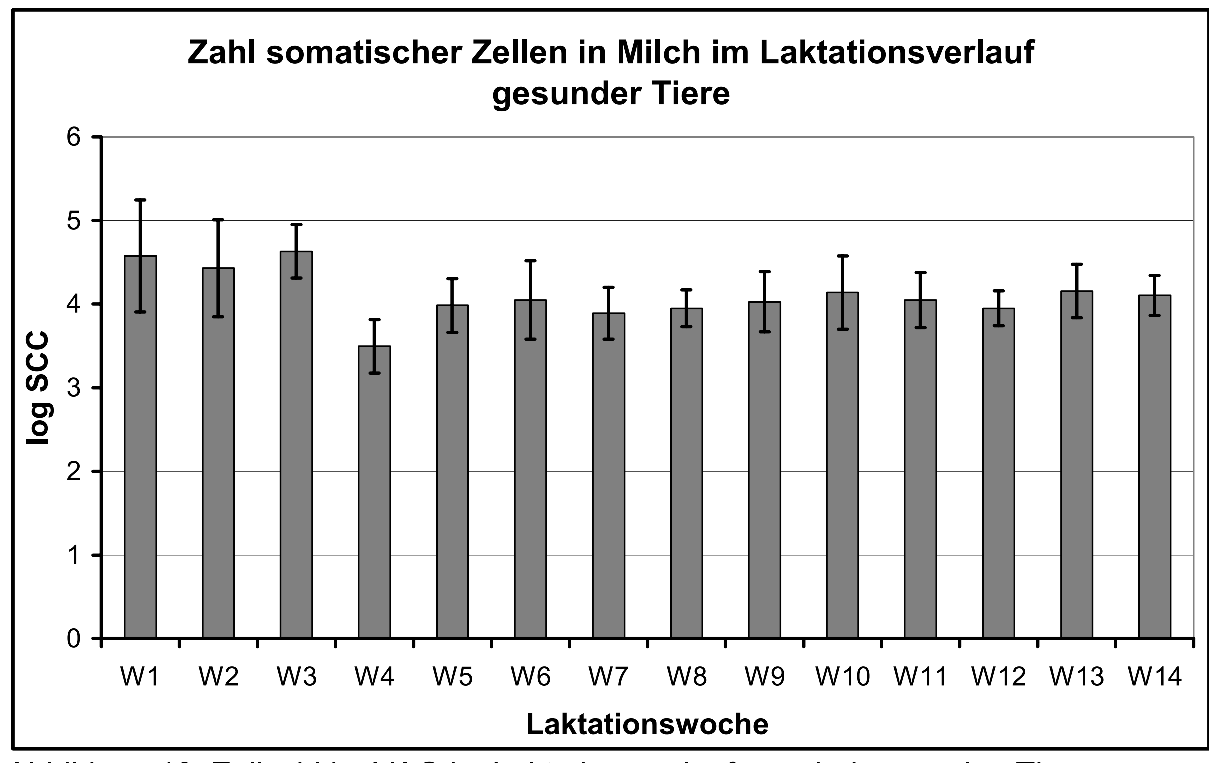


Abbildung 10: Zellzahl im VAG im Laktationsverlauf von drei gesunden Tieren

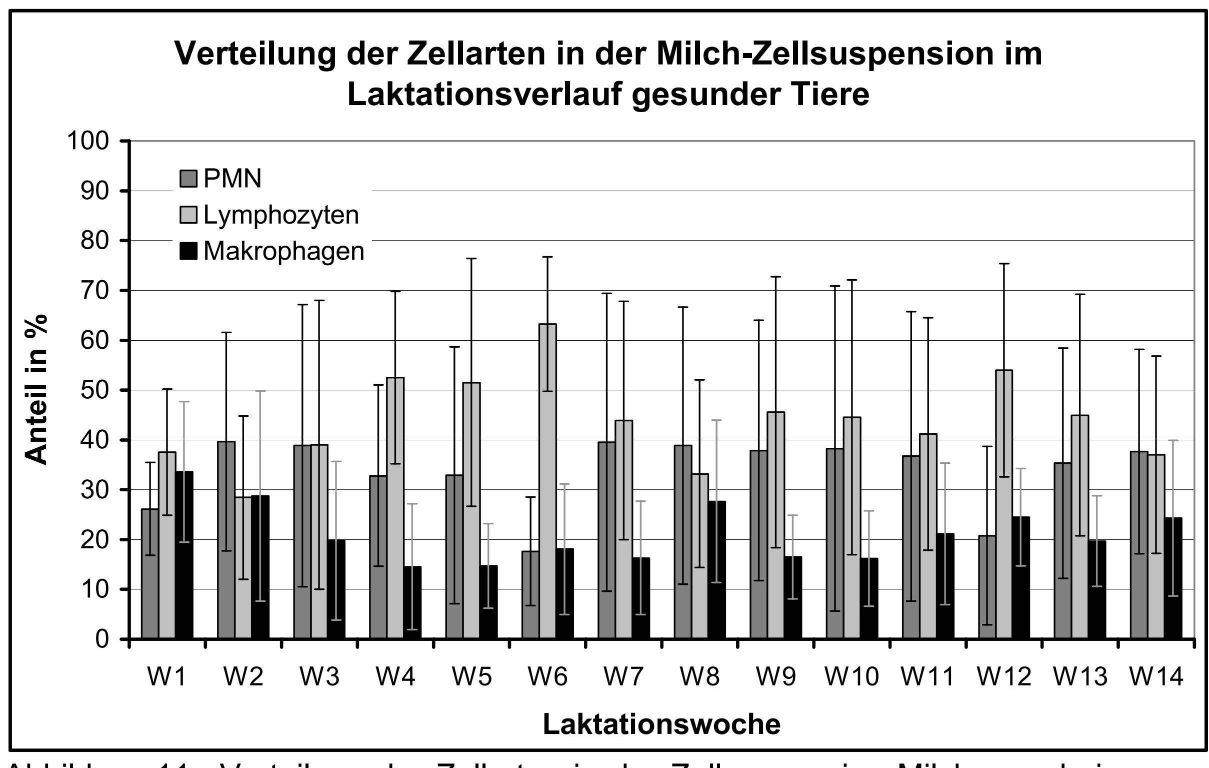


Abbildung 11: Verteilung der Zellarten in der Zellsuspension Milch von drei gesunden Tieren, dargestellt in Laktationswochen

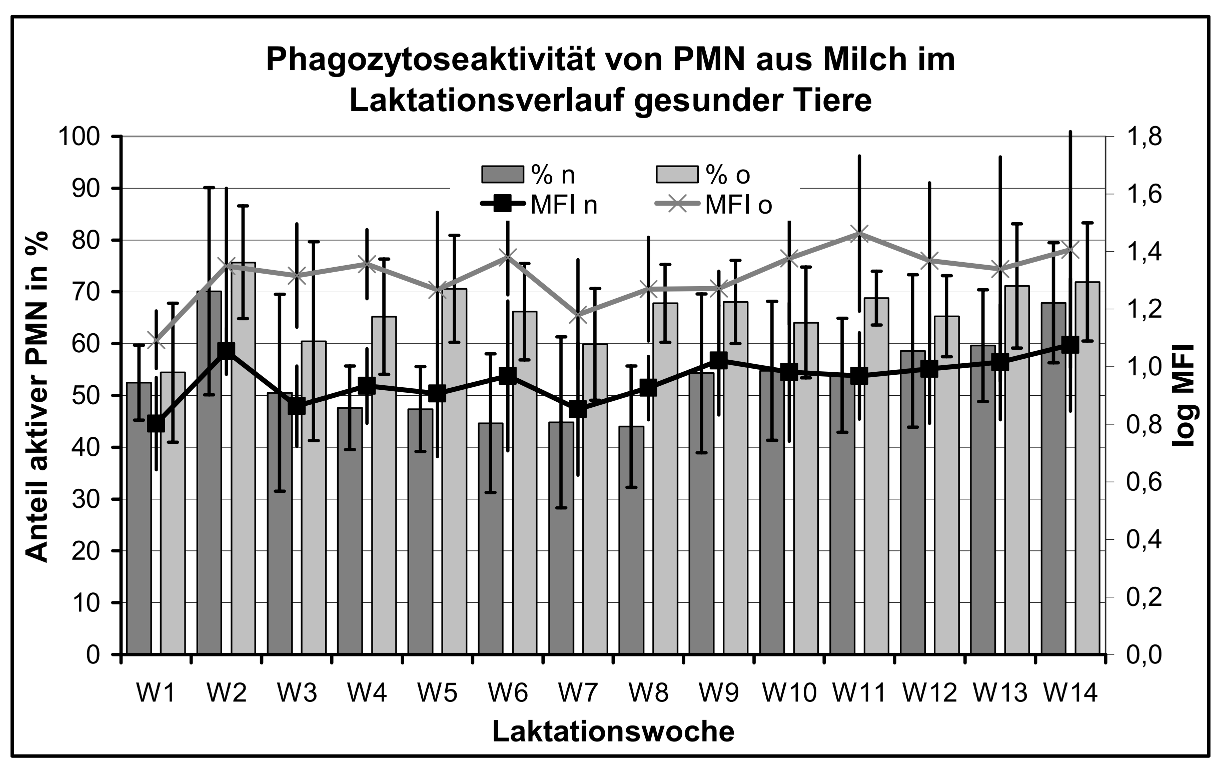


Abbildung 12: Phagozytoseaktivität von aus Milch isolierten Zellen im Verlauf der Laktationswochen W1 bis W14 von drei gesunden Tieren

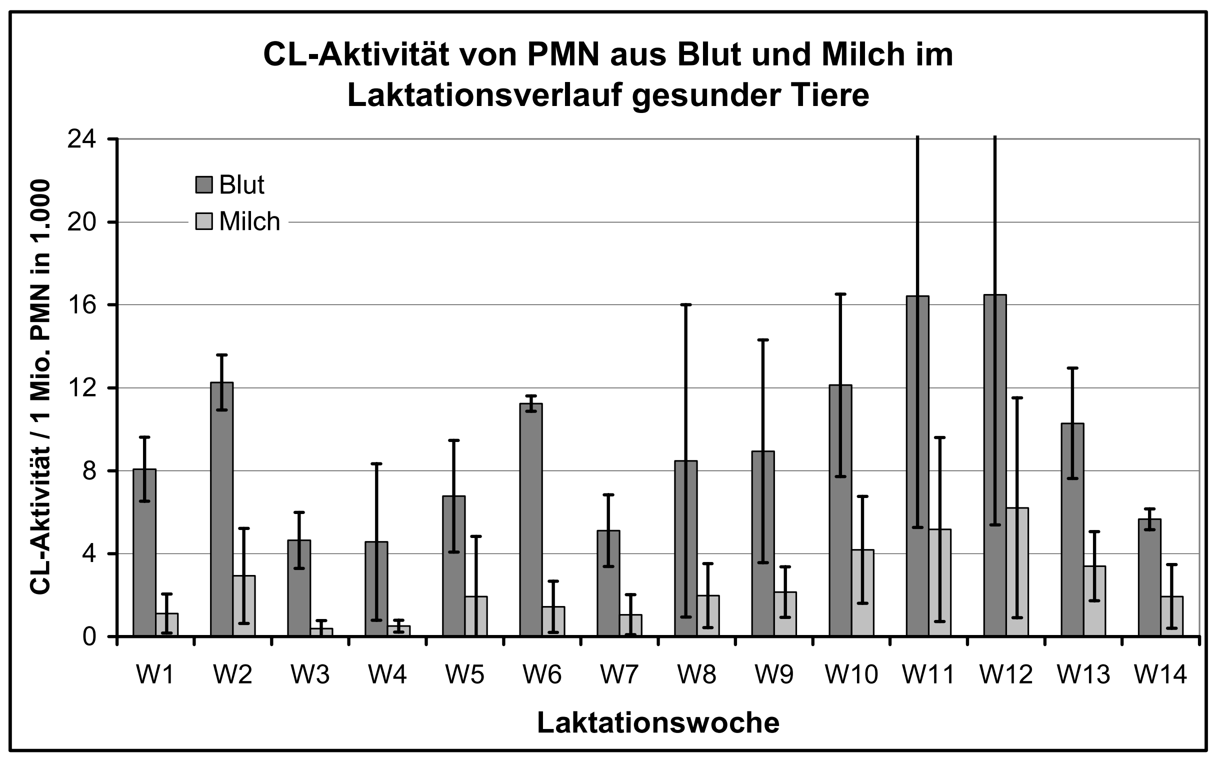


Abbildung 13: CL-Aktivität von aus Blut bzw. Milch isolierten PMN im Laktationsverlauf von drei gesunden Tieren

4.4.2 Tiere mit unspezifischer Mastitis oder Mastitis

Drei Tiere gaben während des Untersuchungszeitraumes in mindestens einem Euterviertel Milch mit über 100.000 Zellen / ml VAG, von denen zwei in den betroffenen Vierteln zudem bakteriologisch positiv waren. Die Viertel mit einem Zellgehalt über 100.000 Zellen / ml Milch wurden als krank bezeichnet. Diese Zellzahlen ließen sich aus jedem der betroffenen Viertel an vier aufeinanderfolgenden Wochen nachweisen. Anhand der Daten dieser Tiere wurde folgendes Schema erstellt:

Woche 0: Woche vor der Erkrankung, n = 8 Viertel
Woche 1: erste Woche der Mastitis, n = 12 Viertel
Woche 2: zweite Woche der Mastitis, n = 12 Viertel
Woche 3: dritte Woche der Mastitis, n = 12 Viertel
Woche 4: vierte Woche der Mastitis, n = 12 Viertel
Woche 5: erste Woche nach der Erkrankung, n = 8 Viertel

Die Höhe einzelner Entzündungsparameter der betroffenen Viertel („kranke Viertel“) und der nicht betroffenen Viertel derselben Tiere („gesunde Viertel“) sind für die einzelnen Wochen in den Abbildungen 14 bis 19 dargestellt.

4.4.2.1 Zellzahl im VAG

Log SCC der kranken Viertel war in den Wochen 1 bis 4 über 5,0, die Werte der gesunden Viertel lagen zwischen 4,1 und 4,6 (Abbildung 14).

4.4.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN im Zelldifferentialbild der Milch-Zellsuspensionen wies in den kranken Vierteln schon in Woche 0 deutlich höhere Werte als in den gesunden Vierteln auf (s. Abbildung 15). Er stieg sowohl in den kranken als auch in den gesunden Vierteln bis Woche 4 kontinuierlich an, und fiel in Woche 5 in beiden Gruppen ab.

4.4.2.3 Zellfunktionalität in Blut und Milch

Die Phagozytoseaktivität stellte sich im Verlauf der Mastitis folgendermaßen dar: In den Wochen 1 bis 5 lag der Anteil aktiver Zellen in den Proben o höher als in den Proben n, und in den gesunden Vierteln stets höher als in den kranken (s. Abbildung 16). In Woche 0 jedoch war der Anteil phagozytierender Zellen der kranken Viertel höher als der der gesunden.

Der Parameter MFI hatte stets in der Gruppe der erkrankten Euterviertel die höheren Werte (s. Abbildung 17).

Die CL-Aktivität / 1 Mio. PMN der aus Blut isolierten PMN war höher als die aus Milch und fiel von Woche 0 bis Woche 5 deutlich ab (s. Abbildung 18). Die Zellen aus kranken Vierteln wiesen eine höhere CL-Aktivität auf als die aus den gesunden Vierteln. In den Wochen 0 und 5 befand sich die CL-Aktivität der kranken Viertel unter 4.000 Einheiten / 1 Mio. PMN, in den Wochen 1 bis 4 darüber. Abgesehen von Woche 2 lag die CL-Aktivität der gesunden Viertel stets unter diesem Wert.

Auch die CL-Aktivität / ml Milch wies in den kranken Vierteln höhere Werte auf als in den gesunden Eutervierteln (s. Abbildung 19). In beiden Gruppen war in Woche 1 eine Zunahme der Aktivität und in Woche 4 ein weiterer Anstieg zu verzeichnen. Woche 5 hatte die niedrigsten Werte.

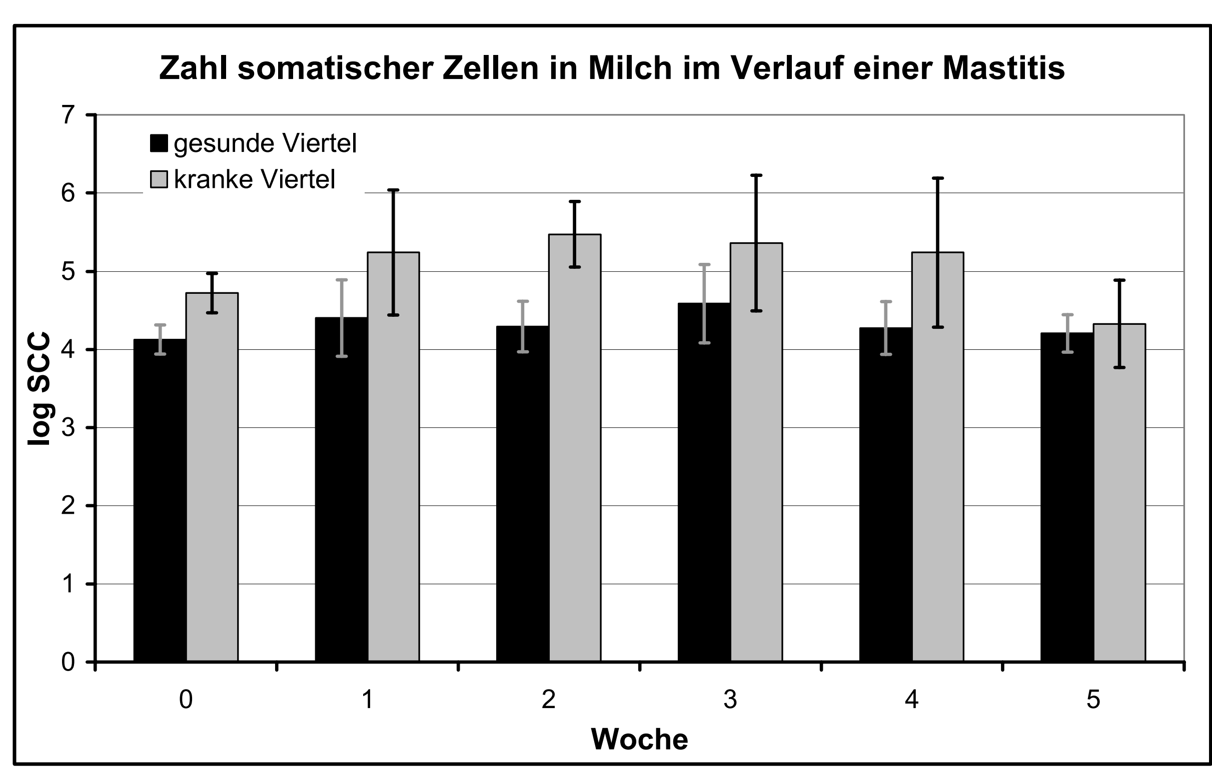


Abbildung 14: Anzahl somatischer Zellen im VAG aus gesunden und kranken Eutervierteln von drei Tieren vor, während und nach einer Mastitis

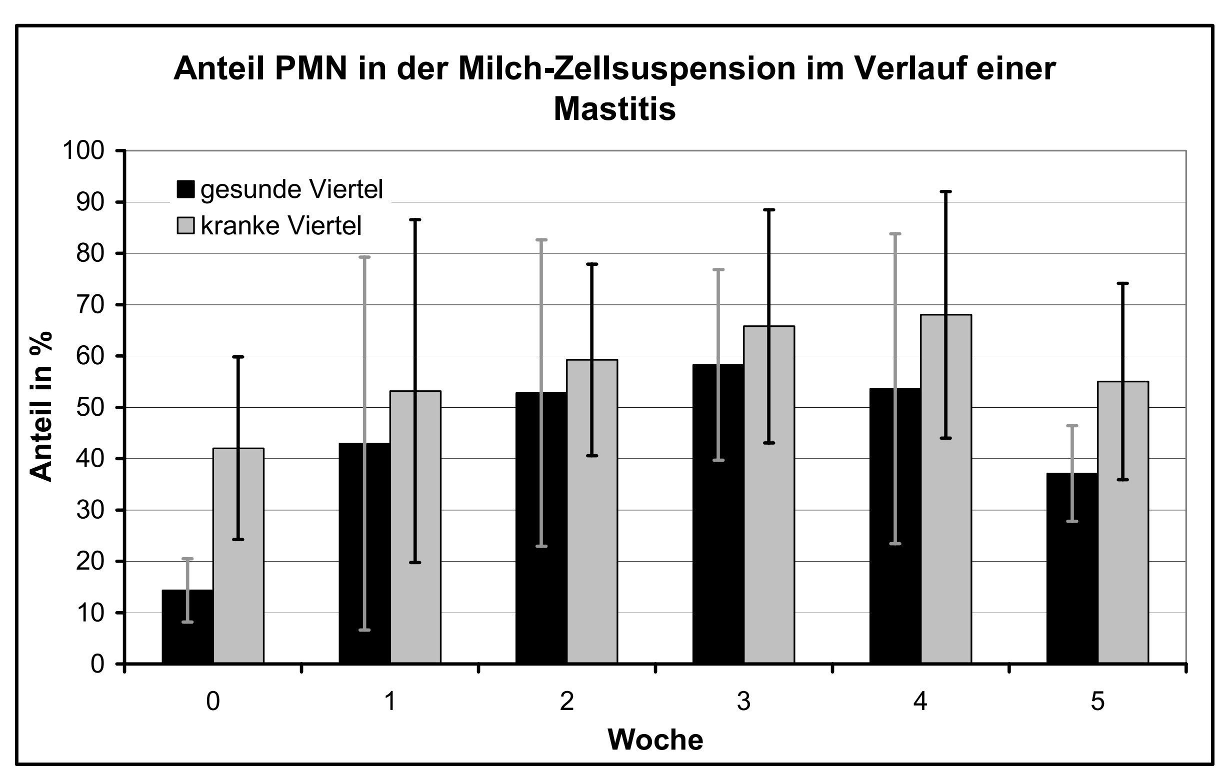


Abbildung 15: Anteil PMN in der Milch-Zellsuspension von gesunden und kranken Vierteln von drei Tieren vor, während und nach einer Mastitis,

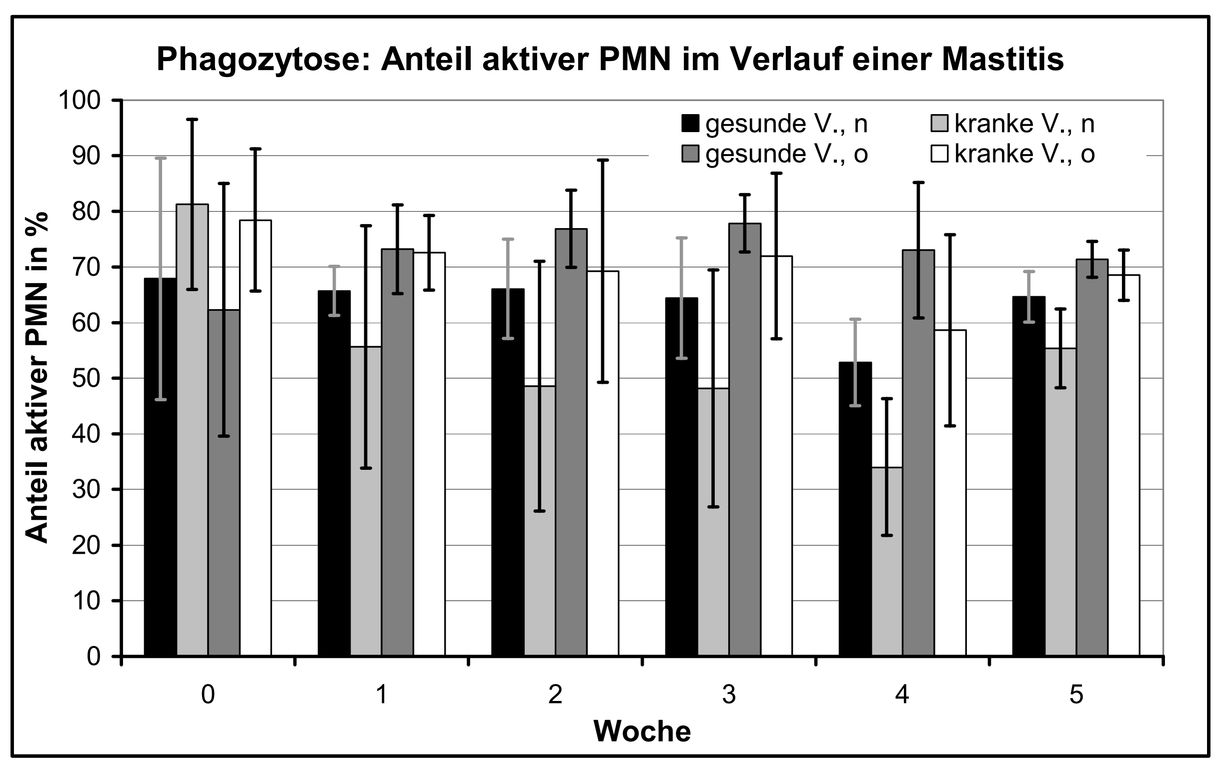


Abbildung 16: Anteil aktiver PMN in der Phagozytose aus Milch von gesunden und kranken Vierteln (V.) von drei Tieren im Verlauf einer Mastitis

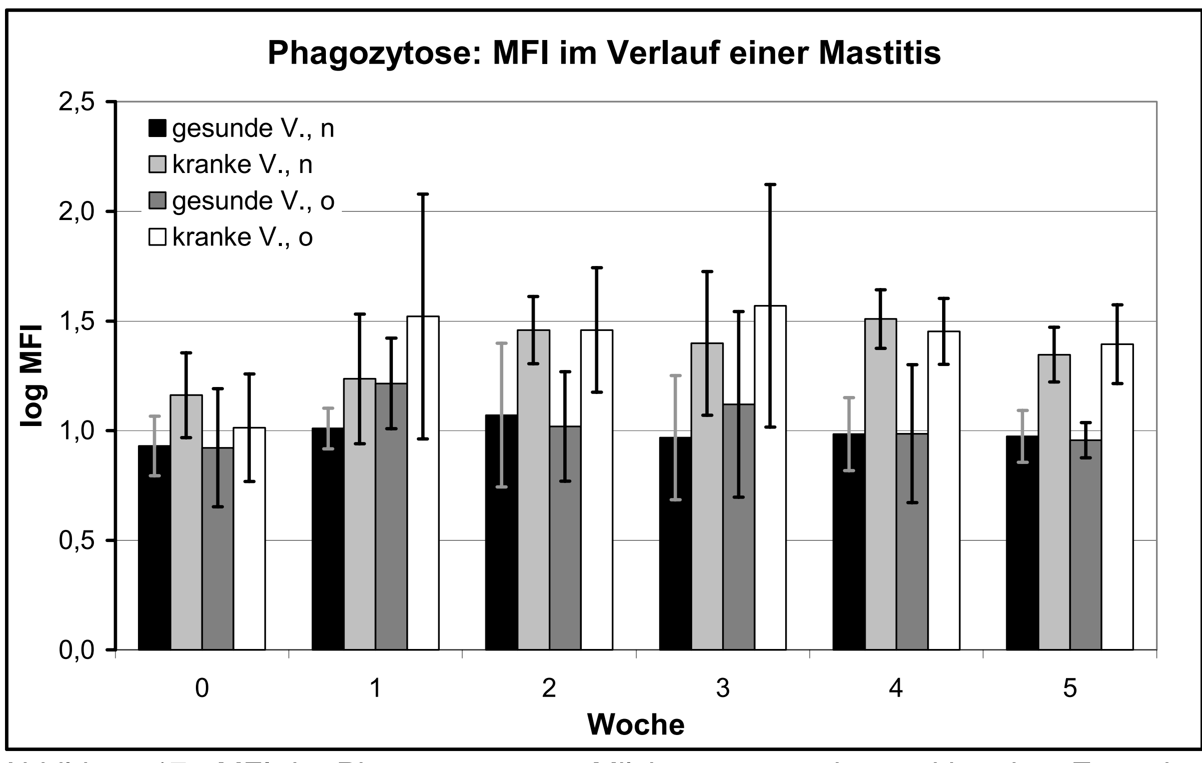


Abbildung 17: MFI der Phagozytose aus Milch von gesunden und kranken Eutervierteln (V.) von drei Tieren vor, während und nach einer Mastitis

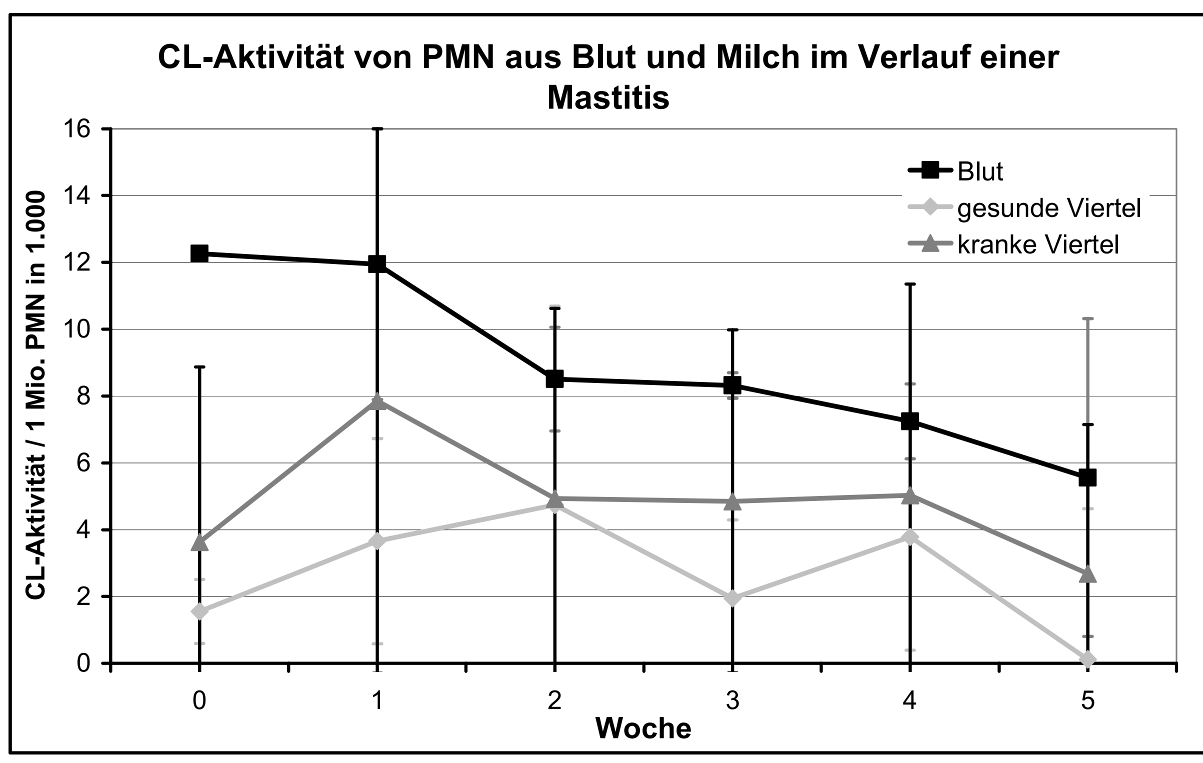


Abbildung 18: CL-Aktivität / 1 Mio. PMN von PMN aus Blut und Milch von gesunden und kranken Vierteln von drei Tieren im Verlauf einer Mastitis

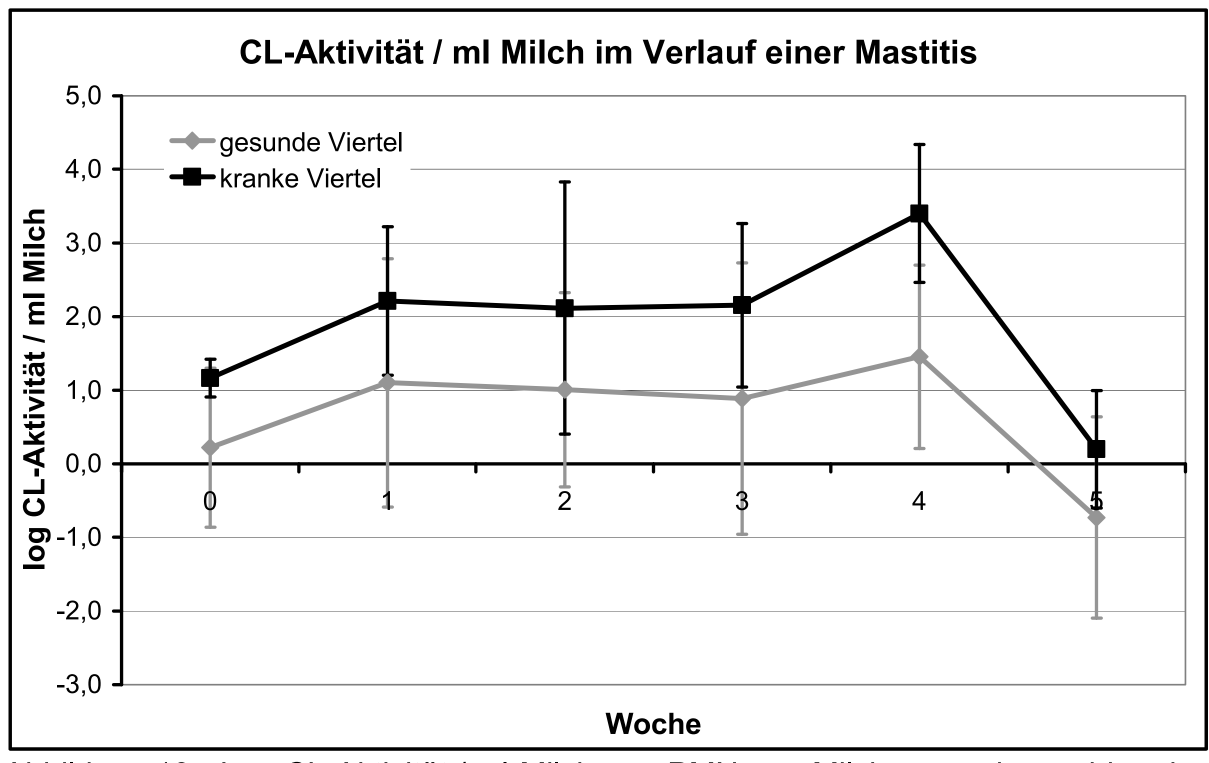


Abbildung 19: Log CL-Aktivität / ml Milch von PMN aus Milch gesunder und kranker Viertel von drei Tieren vor, während und nach einer Mastitis

4.5 Versuch 3: Beurteilung der Eutergesundheit anhand von Kriterien der Zellfunktionalität auf Tierebene

Für die Auswertung dieses Versuches standen 69 Tagesprobensätze von 36 Tieren zur Verfügung (s. Abschnitt 3.9.5). Die statistischen Auswertungen basierten auf den 69 Tagesprobensätzen, die infolge dessen im vorliegenden Abschnitt mit der Bezeichnung „Tier“ belegt wurden (n = 69 Tiere).

Von 10 Tieren lagen mehrere Tagesprobensätze vor. Anhand dieser Daten wurde die Wiederholbarkeit der Untersuchungen berechnet (s. Abschnitt 4.5.1).

In Abschnitt 4.5.2 wurden die Tiere in Gruppen kategorisiert und deren Gesundheitszustand mit Hilfe der Zellzahl und der Zellfunktionalität beschrieben. In einem zweiten Schritt wurden von den als krank eingestuften Tieren die einzelnen Viertel nochmals in Gruppen eingeteilt (Abschnitt 4.5.3). Dafür wurden zunächst die Viertel mit einer Zellzahl über 100.000 Zellen / ml Milch einer näheren Betrachtung unterzogen. Weiterhin wurden diese Viertel mit den dazugehörigen Vierteln verglichen, die eine Zellzahl unter 25.000 Zellen / ml Milch aufwiesen. Auch der Vergleich der Daten als gesund eingeordneter Tiere mit denen Befunden gesunder Viertel erkrankter Tiere wurde durchgeführt.

Die Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Zellzahl, dem bakteriologischen Status des Euterviertels im Rahmen der Mastitiskategorisierung und der Zellfunktionalität werden in Abschnitt 4.5.4 beschrieben.

In den Abbildungen 20 und 21 (s. Abschnitt 4.5.4) sind die in diesem Versuch gebildeten Gruppen dargestellt.

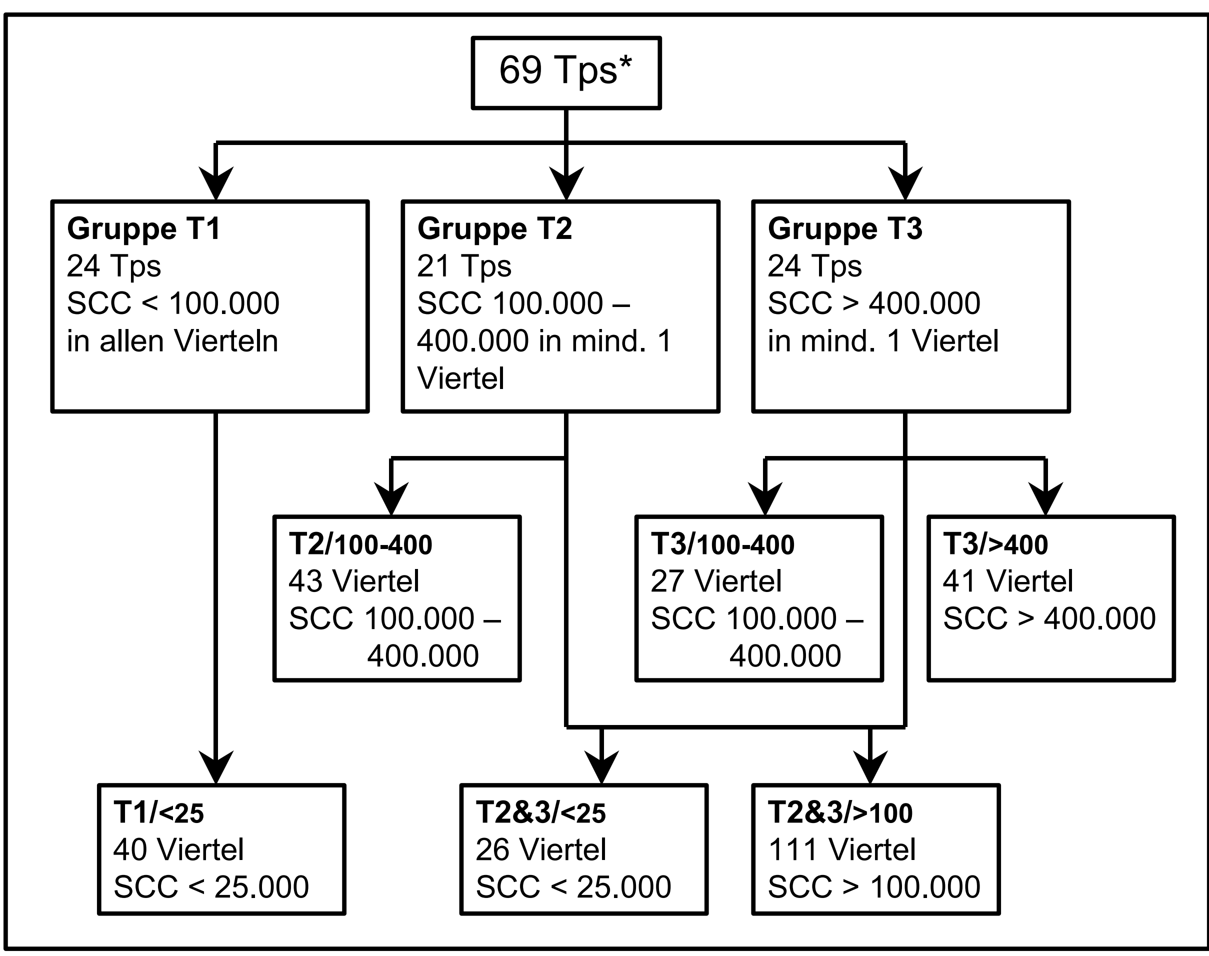


Abbildung 20: Gruppeneinteilung für Versuch 3;
*Tps: Tagesprobensatz; SCC: Anzahl somatischer Zellen / ml VAG

4.5.1 Mehrfach untersuchte Tiere

Zehn Tiere wurden an drei aufeinander folgenden Tagen und ein weiteres Mal im Abstand von etwa einer Woche untersucht. In die Berechnungen zur Wiederholbarkeit flossen jeweils nur die Daten der drei zusammenhängenden Tage ein. Die Ergebnisse sind in Tabelle 42 als Signifikanzen wiedergegeben. Außer im Anteil Makrophagen in Milch unterschieden sich die Ergebnisse der drei aufeinander folgenden Tage nicht voneinander.

Tabelle 42: Signifikanzen der Blut- und Milchwerte zwischen den Tagen der mehrfach untersuchten Tiere

Parameter	WBC	PMN B	CL-Aktivität B	LF	log SCC	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M
Signifikanz	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Parameter	Lym M	Makro M	Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
Signifikanz	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,5$;

*: $p < 0,5$

4.5.2 Gruppen auf Basis der Zellzahl

4.5.2.1 Blutproben

4.5.2.1.1 Korrelationen

4.5.2.1.1.1 Vollblutuntersuchungen

Tabelle 43 stellt Korrelationskoeffizienten zwischen dem Anteil PMN im Vollblut und Parametern des weißen Blutbildes sowie der Zellfunktionalität aus Blut dar.

Tabelle 43: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Blutproben zum Anteil PMN in Blut (n = 69)	
Parameter	k
WBC	0,19
eosinophile Granulozyten B	0,04
Lymphozyten B	-0,83
CL-Aktivität B	0,09
log Max	-0,09
Time	-0,06

n: Stichprobengröße (Tiere)

4.5.2.1.1.2 Zellfunktionalität in Blut

In Tabelle 44 sind die Korrelationskoeffizienten der Parameter der Zellfunktionalität aus Blut aufgeführt.

Tabelle 44: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter der Zellfunktionalität aus Blutzellen zueinander (n = 69)		
Parameter 1	Parameter 2	k
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log Max	0,79
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	Time	-0,48
log Max	Time	-0,41

n: Stichprobengröße (Tiere)

4.5.2.1.2 Gruppenvergleich

Die vier Viertel eines Tieres waren stets in derselben Gruppe. Daher konnte der Blutwert eines Tieres einer konkreten Gruppe zugeordnet werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der aus Blut gewonnen Informationen sind, aufgegliedert in die Gruppen T1 bis T3, in den Tabelle 45 dargestellt. Die Signifikanzen zwischen diesen Gruppen sind in Tabelle 46 zusammengefasst.

4.5.2.1.2.1 Vollblutuntersuchungen

Die Parameter WBC und eosinophile Granulozyten im Blut stiegen von Gruppe T1 bis Gruppe T3 an. Der Anteil PMN B war in Gruppe T1 niedriger als in den beiden anderen Gruppen.

Tabelle 45: Grunddaten der Gruppen T1 bis T3 der aus Blut gewonnenen Daten

Gruppe		WBC	PMN B	Eos B	Lym B	CL-Aktivität B	log Max	Time
T1	X	7,0	40,9	5,1	50,4	10.218	0,06	1.551
	± sd	1,5	12,4	2,4	10,2	3.513	0,16	302
	n	24	24	24	24	23	23	23
T2	X	7,3	45,2	5,8	46,2	8.431	-0,06	1.683
	± sd	1,3	10,5	2,9	9,6	3.071	0,22	296
	n	20	20	20	20	20	20	20
T3	X	7,8	45,0	7,4	45,9	10.893	0,06	1.291
	± sd	1,3	8,8	3,5	9,6	5.018	0,25	403
	n	24	24	24	24	24	24	24

X: arithmetischer Mittelwert;
sd: Standardabweichung;
n: Stichprobengröße (Tiere)

4.5.2.1.2.2 Zellfunktionalität in Blut

Die CL-Aktivität B (8.431 Einheiten / 1 Mio. PMN) und log Max (-0,06) hatten in Gruppe T2 die niedrigsten Werte. Der Wert des Parameters Time war in Gruppe T3 mit 1.291 Sekunden signifikant niedriger als in den Gruppen T1 und T2 (s. Tabelle 46).

Tabelle 46: Signifikanzen der Blutwerte zwischen den Gruppen T1 bis T3								
Gruppen		WBC	PMN B	Eos B	Lym B	CL-Aktivität B	log Max	Time
T1	T2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
T1	T3	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	*
T2	T3	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	***
Allgemein		n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	**

n. s.: nicht signifikant, p ≥ 0,05; *: p < 0,05;
**: p < 0,01; ***: p < 0,001

4.5.2.2 Milchproben

4.5.2.2.1 Korrelationen

4.5.2.2.1.1 Eutergesundheit

Tabelle 47: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Milchzellen zu log SCC im VAG		
Parameter	Stichprobengröße	k
elektrische Leitfähigkeit	264	0,34
NAGase VAG	274	0,53
NAGase VGH	275	0,50
PMN M	274	0,63
Lymphozyten M	274	-0,49
Makrophagen M	274	-0,48
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN Milch	269	0,38
log Max	269	0,66
Time	269	-0,66
log CL-Aktivität / ml Milch	268	0,89

Stichprobengröße: Viertel

Tabelle 47 zeigt Korrelationen zwischen der Zellzahl und den erhobenen Parametern der Zelldifferenzierung sowie der Zellfunktionalität auf.

4.5.2.2.1.2 Zelldifferentialbild in Milch

Tabelle 48 stellt Zusammenhänge zwischen dem Anteil PMN in der Milchzellsuspension und der CL-Aktivität in Milch dar.

Tabelle 48: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Milchzellen zum Anteil PMN in Milch

Parameter	Stichprobenzahl	k
Lymphozyten M	277	-0,65
Makrophagen M	277	-0,86
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	269	0,24
log Max	269	0,63
Time	269	-0,52
log CL-Aktivität / ml Milch	268	0,70

Stichprobengröße: Viertel

4.5.2.2.1.3 Zellfunktionalität in Milch

In Tabelle 49 sind die Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Parameter der Zellfunktionalität aus Milch zueinander dargestellt.

Tabelle 49: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter der Zellfunktionalität aus Milchzellen zueinander (n = 270 Euterviertel)

Parameter 1	Parameter 2	n	k
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log Max	270	0,54
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	Time	270	-0,46
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log CL-Aktivität / ml Milch	269	0,59
log Max	Time	270	-0,68
log Max	log CL-Aktivität / ml Milch	269	0,41
Time	log CL-Aktivität / ml Milch	269	-0,73

4.5.2.2.2 Gruppenvergleich

Die Grunddaten der drei Gruppen T1, T2 und T3 der aus Milch gewonnenen Daten sind in Tabelle 50 aufgeführt. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind für die einzelnen Parameter in Tabelle 51 ersichtlich.

4.5.2.2.2.1 Eutergesundheit

Die herkömmlichen Entzündungsparameter log SCC im VAG, NAGase VAG und NAGase VGH stiegen mit steigender Gruppenzahl signifikant an (s. Tabelle 51).

4.5.2.2.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Im Zelldifferentialbild aus Milch stieg der Anteil PMN von 28,9 % (Gruppe T1) auf 72,3 % (Gruppe T3) an. Die Anteile der Lymphozyten und Makrophagen sanken von 22,3 % bzw. 45,5 % (Gruppe T1) auf 8,7 % bzw. 18,2 % (Gruppe T3).

4.5.2.2.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Unter den funktionellen Parametern wiesen CL-Aktivität Milch, log Max und log CL-Aktivität / ml Milch signifikant steigende Werte auf (s. Tabelle 51). Die Zeit bis zum Erreichen des Maximums (Time) verkürzte sich von 1.980 Sekunden (Gruppe T1) auf 1.334 Sekunden (Gruppe T3).

Tabelle 50: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der aus Milch gewonnenen Daten der Gruppen T1 bis T3

Gruppe		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
T1	X	4,37	0,76	0,22	0,18	28,9	22,3	45,5
	± sd	0,29	0,06	0,17	0,19	19,5	14,8	20,1
	n	96	92	96	96	96	96	96
T2	X	4,88	0,77	0,37	0,36	53,2	14,4	31,3
	± sd	0,50	0,08	0,31	0,31	25,5	10,6	20,7
	n	84	76	83	84	84	84	84
T3	X	5,37	0,78	0,48	0,41	72,3	8,7	18,2
	± sd	0,61	0,05	0,35	0,33	20,7	9,9	12,6
	n	92	93	93	93	93	93	93

Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
T1	X	75,7	5.040	-1,38	1.980	1,11
	± sd	11,5	5.079	0,64	401	0,75
	n	91	91	91	91	90
T2	X	78,3	5.695	-0,95	1.799	2,00
	± sd	12,2	3.791	0,67	411	0,99
	n	84	84	84	84	84
T3	X	78,6	8.856	-0,57	1.334	2,89
	± sd	16,8	6.138	0,60	563	0,95
	n	93	93	93	93	91

X: arithmetischer Mittelwert;

sd: Standardabweichung;

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 51: Signifikanzen der aus Milchproben gewonnenen Daten zwischen den Gruppen T1, T2 und T3

Gruppen		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
T1	T2	***	n. s.	***	***	***	***	***
T1	T3	***	**	***	***	***	***	***
T2	T3	***	n. s.	*	n. s.	***	**	***
Allgemein		***	n. s.	***	***	***	***	***

Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
T1	T2	n. s.	n. s.	***	**	***
T1	T3	n. s.	***	***	***	***
T2	T3	n. s.	***	***	***	***
Allgemein		n. s.	***	***	***	***

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,05$; *: $p < 0,05$;
**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.5.3 Euterkranke Tiere

Die Gruppe T1 setzt sich aus Vierteln zusammen, die alle der gleichen Zellzahlklasse angehören (SCC < 100.000 Zellen / ml). In den Gruppen T2 und T3 befinden sich Datensätze mit Zellzahlen über 100.000 Zellen / ml Milch, aber auch solche mit geringeren Zellzahlen. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurden die Datensätze der Gruppen T2 und T3 erneut kategorisiert.

4.5.3.1 *Kranke Viertel (T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400)*

Zunächst wurden die als krank eingestuften Viertel vergleichend ausgewertet. Dazu wurden die Viertel mit Zellzahlen > 100.000 Zellen / ml Milch wie in Tabelle 52 dargestellt gruppiert.

Tabelle 52: Gruppenbildung für die Auswertung der euterkranken Tiere (kranke Viertel)

Gruppe	n	Zellzahl / ml Milch	aus Gruppe
T2/100–400	43	100.000 – 400.000	T2
T3/100–400	27	100.000 – 400.000	T3
T3/>400	41	> 400.000	T3
T2&3/>100	111	> 100.000	T2 & T3

n: Stichprobengröße (Viertel)

4.5.3.1.1 Blutproben

In Abschnitt 4.5.3, wie auch in vielen anderen Abschnitten der Arbeit, waren die vier Viertel eines Tieres nicht zwangsläufig in derselben Gruppe vertreten. Sind die Viertel eines Tagesprobensatzes in verschiedenen Gruppen, so lassen sich die Ergebnisse der Blutprobe dieses Datensatzes nicht einer bestimmten Gruppe zuordnen und sind daher nicht auswertbar.

4.5.3.1.2 Milchproben

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der aus Milch gewonnenen Daten der Gruppen T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400 sind in Tabelle 53 dargestellt, die Signifikanzen zwischen den Gruppen finden sich in Tabelle 54.

Tabelle 53: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der Milchwerte der Gruppen T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400

Gruppe		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
T2/100–400	X	5,29	0,78	0,47	0,49	62,1	10,3	25,6
	± sd	0,17	0,09	0,30	0,33	23,7	8,7	20,0
	n	43	40	42	43	43	43	43
T3/100–400	X	5,29	0,79	0,42	0,40	72,5	7,3	19,9
	± sd	0,18	0,06	0,28	0,28	21,5	7,9	14,6
	n	27	27	27	27	27	27	27
T3/>400	X	5,91	0,79	0,62	0,55	78,7	6,0	14,6
	± sd	0,27	0,05	0,31	0,30	17,4	8,7	10,9
	n	41	41	41	41	41	41	41

Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
T2/100–400	X	79,9	6.865	-0,62	1.633	2,69
	± sd	12,6	3.743	0,40	328	0,42
	n	43	43	43	43	43
T3/100–400	X	79,8	10.357	-0,38	1.363	2,97
	± sd	13,6	5.512	0,37	326	0,42
	n	27	27	27	27	27
T3/>400	X	80,2	9.904	-0,40	1.052	3,59
	± sd	15,8	5.700	0,50	482	0,52
	n	41	41	41	41	41

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 54: Signifikanzen der Milchwerte zwischen den Gruppen T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400

Gruppen		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
T2/100–400	T3/100–400	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
T2/100–400	T3/>400	***	n. s.	*	n. s.	***	*	**
T3/100–400	T3/>400	***	n. s.	**	*	n. s.	n. s.	n. s.
Allgemein		*	n. s.	n. s.	n. s.	**	n. s.	**

Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
T2/100–400	T3/100–400	n. s.	**	*	**	**
T2/100–400	T3/>400	n. s.	**	*	***	***
T3/100–400	T3/>400	n. s.	n. s.	n. s.	**	***
Allgemein		n. s.	**	*	***	***

n. s.: nicht signifikant, p ≥ 0,05; *: p < 0,05;
**: p < 0,01; ***: p < 0,001

4.5.3.1.2.1 Eutergesundheit

Die Zellzahl im VAG der Gruppe T3/>400 war signifikant höher als die der beiden anderen Gruppen (s. Tabelle 54).

4.5.3.1.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Obwohl die elektrische Leitfähigkeit und SCC in den Gruppen T2/100–400 und T3/100–400 gleich waren, lag der Anteil PMN (72,5 %) in der Milch in Gruppe T3/100–400 deutlich höher.

4.5.3.1.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die CL-Aktivität in Milch (7.962 Einheiten / 1 Mio. PMN) sowie log Max (-0,62) der Gruppe T2/100–400 hatten signifikant niedrigere Werte als die der beiden anderen Gruppen. Bezüglich der Parameter Time und log CL-Aktivität / ml Milch unterschieden sich die Werte in allen Gruppenpaaren signifikant (s. Tabelle 54).

4.5.3.2 Vergleich gesunder Viertel kranker Kühe (Gruppe T2&3/<25) mit denen gesunder Kühe (Gruppe T1/<25)

Die Viertel der Gruppen T2 und T3, deren Zellzahlen 25.000 / ml nicht überschritten, wurden in einer Gruppe T2&3/<25 zusammengefasst und mit den Vierteln aus Gruppe T1 verglichen, die ebenfalls höchstens 25.000 Zellen / ml VAG hatten (Gruppe T1/<25) (s. Tabelle 55).

Tabelle 55: Gruppenbildung für die Auswertung der euterkranken Tiere (gesunde Viertel)

Gruppe	n	Zellzahl / ml Milch	aus Gruppe
T1/<25	40	≤ 25.000	T1
T2&3/<25	26	≤ 25.000	T2 & T3

n: Stichprobengröße (Viertel)

4.5.3.2.1 Blutproben

Eine Auswertung der Daten aus Blut wurde wie in Abschnitt 4.5.3.1.1 beschrieben nicht durchgeführt.

4.5.3.2.2 Milchproben

In Tabelle 56 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen T1/<25 und T2&3/<25 einschließlich der Signifikanzen zwischen den Gruppen dargestellt.

Tabelle 56: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der Milchwerte der Gruppen T1/<25 und T2&3/<25 und Signifikanzen zwischen den Gruppen

Gruppe		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
T1/<25	X	4,12	0,75	0,13	0,08	22,4	25,0	43,9
	± sd	0,12	0,03	0,13	0,15	10,9	17,8	22,8
	n	40	40	40	40	40	40	40
T2&3/<25	X	4,15	0,74	0,20	0,22	38,4	19,1	28,1
	± sd	0,13	0,03	0,30	0,23	10,0	14,2	17,5
	n	26	25	26	26	26	26	26
Signifikanzen		n. s.	n. s.	n. s.	**	***	n. s.	**

Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
T1/<25	X	71,7	4.780	-1,58	2.162	0,72
	± sd	10,4	5.810	0,65	450	0,67
	n	40	40	40	40	39
T2&3/<25	X	70,2	2.592	-1,78	2.124	0,66
	± sd	19,0	2.105	0,47	434	0,71
	n	26	26	26	26	26
Signifikanzen		n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.

n: Stichprobengröße (Viertel); **: $p < 0,01$;
n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,05$; ***: $p < 0,001$
*: $p < 0,05$;

4.5.3.2.2.1 Eutergesundheit

Die Parameter LF, SCC im VAG und NAGase VAG unterschieden sich nicht signifikant (s. Tabelle 56).

4.5.3.2.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN in Milch war mit 38,4 % in Gruppe T2&3/<25 signifikant höher ($p < 0,001$) als in Gruppe T1/<25 (22,4 %).

4.5.3.2.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die CL-Aktivität / 1 Mio. PMN war in Gruppe T2&3/<25 mit 2.592 Einheiten (Gruppe T1/<25: 4.780 Einheiten) ebenso niedriger wie die log CL-Aktivität / ml Milch mit 0,66 (Gruppe T1/<25: 0,72).

4.5.3.3 Vergleich der gesunden Viertel kranker Kühe (Gruppe T2&3/<25) mit den kranken Vierteln derselben Tiere (Gruppe T2&3/>100)

Die Gruppe der gesunden Viertel kranker Kühe (T2&3/<25, s. Tabelle 55) wurde mit den dazugehörigen kranken Vierteln dieser Tiere verglichen. Um eine Gruppe „kranke Viertel" zu bilden, wurden die Gruppen T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400 in einer Gruppe zusammengeführt (T2&3/>100, s. Tabelle 52).

4.5.3.3.1 Blutproben

Die Daten aus Blut wurden nicht ausgewertet (s. Abschnitt 4.5.3.1.1).

4.5.3.3.2 Milchproben

Tabelle 57 gibt Mittelwerte, Standardabweichungen der Milchparameter und die Signifikanzen zwischen den Gruppen T2&3/<25 und T2&3/>100 wieder.

4.5.3.3.2.1 Eutergesundheit

Die Werte der Parameter elektrische Leitfähigkeit, log SCC im VAG, NAGase VAG und NAGase VGH waren in Gruppe T2&3/>100 signifikant höher (s. Tabelle 57).

Tabelle 57: Mittelwerte (X), Standardabweichungen (sd) der Milchparameter der Gruppen T2&3/<25 und T2&3/>100 und Signifikanzen zwischen diesen Gruppen								
Gruppe		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
T2&3/<25	X	4,15	0,74	0,20	0,22	38,4	19,1	28,1
	± sd	0,13	0,03	0,30	0,23	10,0	14,2	17,5
	n	26	25	26	26	26	26	26
T2&3/>100	X	5,52	0,79	0,51	0,49	70,8	8,0	20,1
	± sd	0,37	0,07	0,31	0,31	22,1	8,7	16,4
	n	111	108	110	111	111	111	111
Signifikanzen		***	***	***	***	***	***	*

Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
T2&3/<25	X	70,2	2.592	-1,78	2.124	0,66
	± sd	19,0	2.105	0,47	434	0,71
	n	26	26	26	26	26
T2&3/>100	X	80,0	8.837	-0,48	1.353	3,09
	± sd	13,9	5.182	0,45	464	0,61
	n	111	111	111	111	111
Signifikanzen		*	***	***	***	***

n: Stichprobengröße (Viertel); **: p < 0,01;
n. s.: nicht signifikant, p ≥ 0,05; ***: p < 0,001
*: p < 0,05;

4.5.3.3.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Statistisch abgesicherte Unterschiede fanden sich auch im Zelldifferentialbild, in welchem die Gruppe T2&3/>100 bezüglich der PMN größere und bezüglich der Lymphozyten und Makrophagen jeweils kleinere Anteile als Gruppe T2&3/<25 aufwies.

4.5.3.3.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Vitalität war in Gruppe T2&3/>100 mit 80,0 % signifikant höher als in Gruppe T2&3/<25. Der Unterschied in der CL-Aktivität Milch zwischen 2.592 (Gruppe T2&3/<25) und 8.837 Einheiten / 1 Mio. PMN (Gruppe T2&3/>100) war hochsignifikant (s. Tabelle 57). Auch log Max und log CL-Aktivität / ml Milch lagen in Gruppe T2&3/>100 höher.

4.5.4 Bakteriologischer Status und Zellfunktionalität

Alle Daten wurden nach den Kriterien Zellzahl und bakteriologischer Status (Mastitiskategorisierung nach HAMANN u. FEHLINGS 2002, s. Tabelle 1) in Gruppen eingeteilt. Wie in Abschnitt 4.5.2 wurden die vier Viertel eines Tieres stets der selben Gruppe zugeordnet. Die gebildeten Gruppen sind in Tabelle 58 und in Abbildung 21 beschrieben.

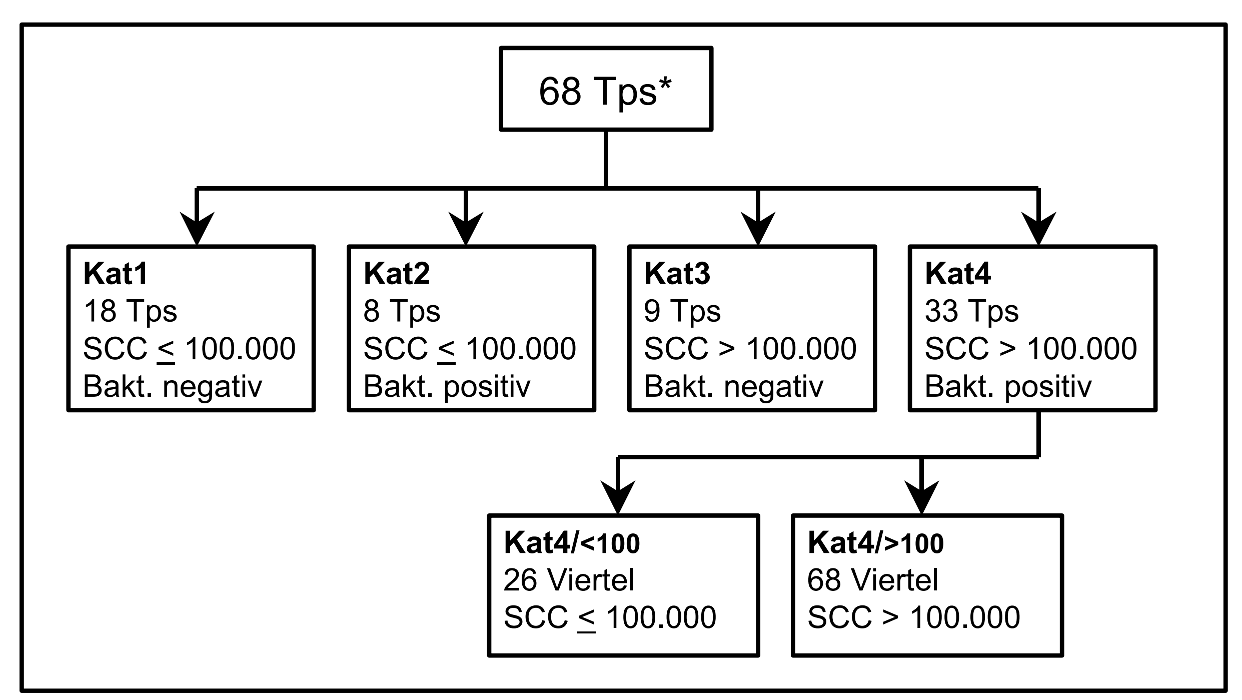


Abbildung 21: Gruppeneinteilung nach Eutergesundheitskategorien; Tps: Tagesprobensätze; SCC: Anzahl somatischer Zellen / ml VAG; Bakt.: Bakteriologie

Tabelle 58: Struktur der Gruppen Kat1 bis Kat4					
Gruppe	n (Tiere)	n (Viertel)	Zellzahl / ml	Bakteriologie	Viertel
Kat1	18	72	≤ 100.000	negativ	alle Viertel des Tieres
Kat2	8	32	≤ 100.000	positiv	mind. ein Viertel die übrigen Viertel wie Kat1
Kat3	9	36	> 100.000	negativ	mind. ein Viertel die übrigen Viertel wie Kat1 oder Kat2
Kat4	33	130	> 100.000	positiv	mind. ein Viertel die übrigen Viertel wie Kat1, Kat2 oder Kat3

n: Stichprobengröße

4.5.4.1 Blutproben

Die Tabelle 59 gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen, Tabelle 60 die Signifikanzen zwischen den Gruppen wieder.

4.5.4.1.1 Vollblutuntersuchungen

Der Parameter WBC hatte in Gruppe Kat4 die höchsten Werte. Der Anteil PMN lag mit 54,5 % in Gruppe Kat3 am höchsten.

4.5.4.1.2 Zellfunktionalität in Blut

Die Werte der CL-Aktivität (7.207 Einheiten / 1 Mio. PMN) und von log Max (-0,19) waren in Gruppe Kat3 am niedrigsten. Die höchsten Werte für diese Parameter fanden sich in Gruppe Kat2 (11.593 Einheiten / 1 Mio. PMN bzw. 0,09).

Tabelle 59: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der Blutwerte der Gruppen Kat1 bis Kat4								
Gruppe		WBC	PMN B	Eos B	Lym B	CL-Aktivität B	log Max	Time
Kat1	X	6,9	43,0	4,9	50,2	9.864	0,05	1.465
	± sd	1,4	11,2	2,4	11,1	3.313	0,19	224
	n	18	18	18	18	16	16	16
Kat2	X	7,1	37,6	6,1	48,9	11.593	0,09	1.726
	± sd	1,6	13,6	3,5	7,6	4.107	0,11	357
	n	8	8	8	8	8	8	8
Kat3	X	7,3	54,5	3,9	39,2	7.207	-0,19	1.652
	± sd	1,4	10,2	1,4	10,3	1.481	0,12	253
	n	9	9	9	9	9	9	9
Kat4	X	7,9	42,6	7,4	47,8	10.214	0,05	1.411
	± sd	1,1	8,1	3,2	8,8	4.755	0,25	445
	n	32	32	32	32	32	32	32

n: Stichprobengröße (Tiere)

Tabelle 60: Signifikanzen der Blutwerte zwischen den Gruppen Kat1 bis Kat4								
Gruppen		WBC	PMN B	Eos B	Lym B	CL-Aktivität B	log Max	Time
Kat1	Kat2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*
Kat1	Kat3	n. s.	*	n. s.	*	*	**	n. s.
Kat1	Kat4	*	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Kat2	Kat3	n. s.	*	n. s.	*	*	***	n. s.
Kat2	Kat4	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Kat3	Kat4	n. s.	***	***	*	**	***	n. s.
Allgemein		n. s.	**	**	*	n. s.	*	n. s.

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,05$; **: $p < 0,01$;

*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

4.5.4.2 Milchproben

Aus den Gruppen Kat1 bis Kat4 wurden für die Parameter der Milchproben Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet (s. Tabelle 61). Die Signifikanzen zwischen diesen Gruppen sind in Tabelle 62 dargestellt.

4.5.4.2.1 Eutergesundheit

Der Parameter log SCC im VAG war in Gruppe Kat4 am höchsten (5,26), in Gruppe Kat3 am zweithöchsten (4,85). Aus den insgesamt 88 bakteriologisch positiven Milchproben der Gruppen Kat2 und Kat4 wurde in 59 % der Proben CNS sowie in 30 % der Proben *S. aureus* nachgewiesen.

4.5.4.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN war in Gruppe Kat4 mit 66,2 % am größten, gefolgt von Gruppe Kat3 mit 54,9 %.

4.5.4.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Werte der Vitalität unterschieden sich zwischen Gruppe Kat3 und Kat4 signifikant (s. Tabelle 62). Gruppe Kat4 wies mit 8.586 Einheiten / 1 Mio. PMN eine signifikant höhere CL-Aktivität als die anderen Gruppen auf. Auch bezogen auf den Parameter log CL-Aktivität / ml Milch hatte die Gruppe Kat4 signifikant höhere Werte als die übrigen Gruppen.

Tabelle 61: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der aus Milchproben erhobenen Daten der Gruppen Kat1 bis Kat4

Gruppe		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
Kat1	X	4,37	0,75	0,22	0,17	28,7	23,1	41,9
	± sd	0,31	0,05	0,17	0,19	18,0	15,0	20,7
	n	71	67	71	71	72	72	72
Kat2	X	4,38	0,77	0,26	0,22	32,6	14,9	39,8
	± sd	0,32	0,06	0,14	0,25	22,7	13,4	26,1
	n	32	32	32	32	32	32	32
Kat3	X	4,85	0,77	0,43	0,53	54,9	13,1	20,8
	± sd	0,72	0,05	0,36	0,26	24,0	11,8	15,2
	n	35	35	36	35	36	36	36
Kat4	X	5,26	0,78	0,43	0,37	66,2	9,9	22,2
	± sd	0,53	0,07	0,34	0,32	24,5	10,3	17,5
	n	129	122	129	130	129	129	129

Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
Kat1	X	74,7	4.950	-1,40	1.992	1,03
	± sd	11,3	4.926	0,69	454	0,80
	n	64	64	64	64	64
Kat2	X	76,7	5.582	-1,35	1.978	1,25
	± sd	12,3	5.372	0,58	244	0,81
	n	31	31	31	31	30
Kat3	X	71,8	5.016	-1,08	1.840	1,95
	± sd	19,0	3.724	0,63	457	1,09
	n	35	35	35	35	35
Kat4	X	80,9	8.586	-0,62	1.439	2,75
	± sd	13,0	5.608	0,59	544	0,92
	n	130	130	130	130	128

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 62: Signifikanzen der aus Milchproben gewonnenen Daten zwischen den Gruppen Kat1 bis Kat4

Gruppen		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
Kat1	Kat2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	**	n. s.
Kat1	Kat3	***	n. s.	**	***	***	***	***
Kat1	Kat4	***	**	***	***	***	***	***
Kat2	Kat3	**	n. s.	*	***	***	n. s.	***
Kat2	Kat4	***	n. s.	***	*	***	n. s.	***
Kat3	Kat4	**	n. s.	n. s.	**	*	n. s.	n. s.
Allgemein		***	*	***	***	***	***	***

Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
Kat1	Kat2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Kat1	Kat3	n. s.	n. s.	*	n. s.	***
Kat1	Kat4	*	***	***	***	***
Kat2	Kat3	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	**
Kat2	Kat4	n. s.	**	***	***	***
Kat3	Kat4	*	***	***	***	***
Allgemein		***	***	***	***	***

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,05$; **: $p < 0,01$;
*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

4.5.4.3 *Differenzierte Auswertung gesunder und kranker Viertel der Tiere mit Mastitis (Gruppen Kat4/<100 und Kat4/>100)*

Die Gruppe Kat4 stellt eine Gruppe dar, in der sowohl bakteriologisch negative als auch positive Viertel enthalten sind. Aus den betroffenen positiven Vierteln, die Zellzahlen über 100.000 Zellen / ml Milch enthielten, und aus den bakteriologisch unauffälligen Vierteln mit Zellzahlen unter 100.000 Zellen / ml Milch wurde jeweils eine

Gruppe gebildet (Gruppe Kat4/>100 bzw. Kat4/<100). Die Daten dieser beiden Gruppen wurden miteinander und mit denen aus Gruppe Kat1 verglichen (s. Tabelle 63).

Tabelle 63: Gruppen für die Auswertung der Tiere mit Mastitis

Gruppe	Stichproben	Zellzahl / ml Milch	Bakteriologie	aus Gruppe
Kat1	72	≤ 100.000	negativ	Kat1
Kat4/<100	26	≤ 100.000	negativ	Kat4
Kat4/>100	68	> 100.000	positiv	Kat4

n: Stichprobengröße (Viertel)

4.5.4.3.1 Blutproben

Wie in Abschnitt 4.5.3.1.1 beschrieben, war eine Auswertung der Daten aus Blut auch hier nicht möglich.

4.5.4.3.2 Milchproben

Die Milchparameter sind in Tabelle 64 nach Mittelwerten und Standardabweichungen für die einzelnen Gruppen dargestellt. Signifikanzen zwischen den Gruppen sind der Tabelle 65 zu entnehmen.

4.5.4.3.2.1 Eutergesundheit

Ebenso wie die Zellzahl im VAG waren die Parameter elektrische Leitfähigkeit, NAGase VAG und VGH in Gruppe Kat4/>100 signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen (s. Tabelle 65).

4.5.4.3.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Die Parameter des Zelldifferentialbildes unterschieden sich signifikant zwischen allen drei Gruppen ($p < 0,001$).

Tabelle 64: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der Milchwerte der Gruppen Kat1, Kat4/<100 und Kat4/>100

Gruppe		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
Kat1	X	4,37	0,75	0,22	0,17	28,7	23,1	41,9
	± sd	0,31	0,05	0,17	0,19	18,0	15,0	20,7
	n	71	67	71	71	72	72	72
Kat4/<100	X	4,56	0,75	0,15	0,13	49,2	16,8	30,9
	± sd	0,26	0,03	0,22	0,24	24,0	11,8	18,9
	n	26	23	26	26	25	25	25
Kat4/>100	X	5,57	0,79	0,49	0,42	72,7	6,1	19,7
	± sd	0,34	0,06	0,31	0,30	22,8	6,3	17,5
	n	68	65	67	68	68	68	68

Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
Kat1	X	74,7	4.590	-1,40	1.992	1,03
	± sd	11,3	4.926	0,69	454	0,80
	n	64	64	64	64	64
Kat4/<100	X	80,7	7.302	-1,13	1.874	1,72
	± sd	12,0	6.615	0,75	580	0,92
	n	26	26	26	26	25
Kat4/>100	X	80,8	10.443	-0,39	1.199	3,24
	± sd	14,7	5.318	0,41	430	0,57
	n	68	68	68	68	68

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 65: Signifikanzen der Milchwerte zwischen den Gruppen Kat1, Kat4/<100 und Kat4/>100

Gruppen		log SCC	log LF	log NAGase VAG	log NAGase VGH	PMN M	Lym M	Makro M
Kat1	Kat4/<100	**	n. s.	n. s.	n. s.	***	*	*
Kat1	Kat4/>100	***	***	***	***	***	***	***
Kat4/<100	Kat4/>100	***	***	***	***	***	***	**

Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
Kat1	Kat4/<100	*	n. s.	n. s.	n. s.	***
Kat1	Kat4/>100	**	***	***	***	***
Kat4/<100	Kat4/>100	n. s.	*	***	***	***

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,05$; **: $p < 0,01$;
*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

4.5.4.3.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Vitalität war in Gruppe Kat1 signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,05$). Die Werte der Parameter CL-Aktivität M und log CL-Aktivität / ml Milch stiegen von Gruppe Kat1 über Gruppe Kat4/<100 zu Gruppe Kat4/>100 kontinuierlich an.

4.6 Gesamtdatenbank: Beurteilung der Eutergesundheit anhand von Kriterien der Zellfunktionalität auf Viertelebene

Die Erstellung der Gesamtdatenbank ist in Abschnitt 3.9.6 beschrieben. In dieser Datenbank ist von jedem Tier nur jeweils ein Datensatz enthalten (171 Viertel von 43 Tieren). Dadurch war es möglich, die einzelnen Viertel als unabhängige Stichproben zu betrachten und entsprechende Varianzanalysen und Student´s t-Tests zu berechnen. Mit der Gesamtdarstellung wurden die Zusammenhänge zwischen der Zellzahl und der Zellfunktionalität in Milch untersucht. Auf eine Auswertung der Parameter, die aus den Blutproben erhoben worden sind, wurde in diesem Kapitel verzichtet.

Daraufhin folgte die Einordnung der Daten in drei Gruppen auf der Grundlage der Zellzahl (s. Abbildung 22; Abschnitt 4.6.1).

Um die Aussagekraft der funktionellen Parameter zu ermitteln, wurden die Daten erneut kategorisiert, wobei das Kriterium CL-Aktivität / 1 Million PMN in Milch für die Gruppenzugehörigkeit ausschlaggebend war (Abschnitt 4.6.2).

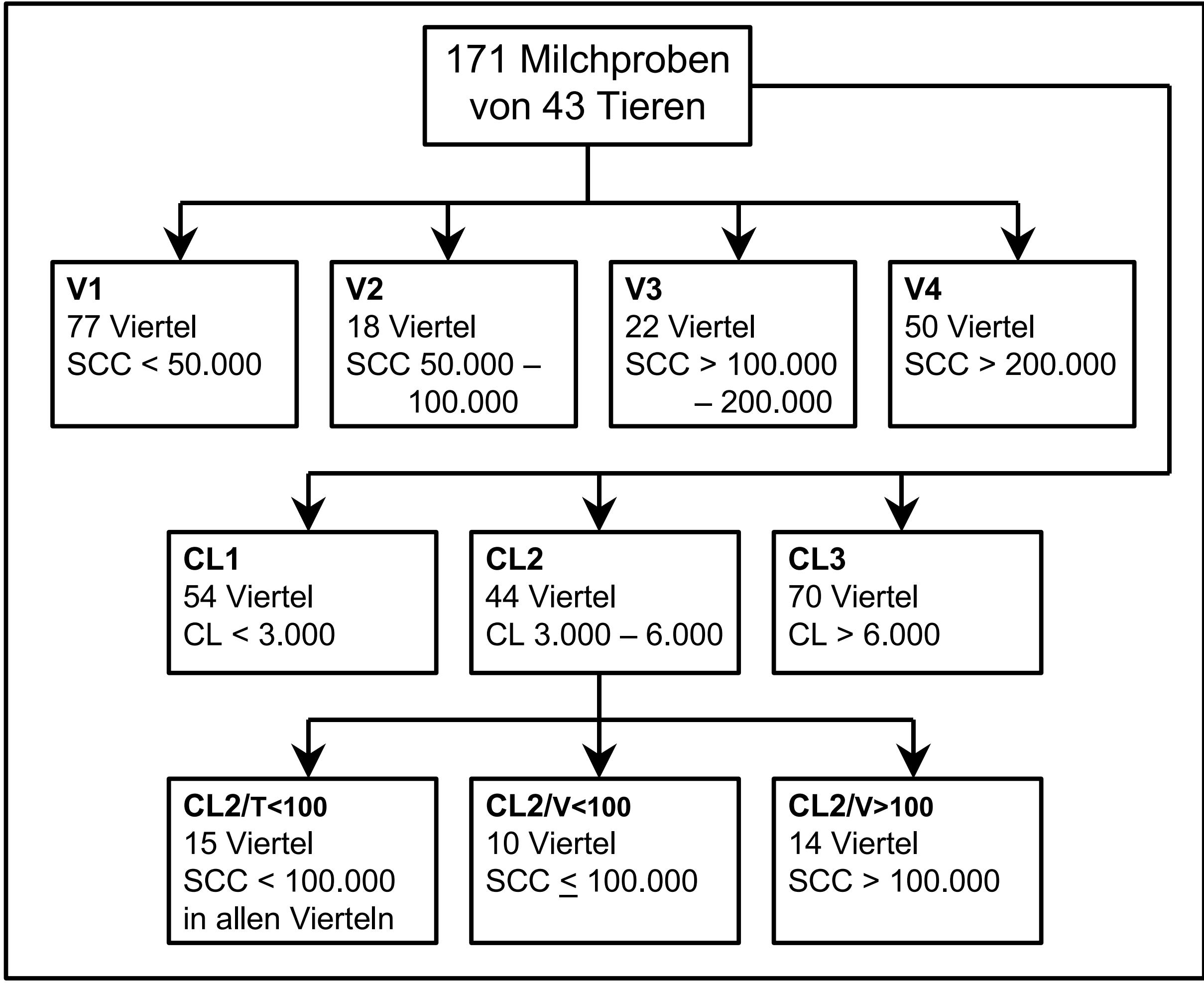


Abbildung 22: Gruppeneinteilung der Gesamtdatenbank;
SCC: Anzahl somatischer Zellen / ml VAG;
CL: CL-Einheiten / 1 Mio. PMN

4.6.1 Gruppen auf Basis der Zellzahl

Aus der Gesamtheit der Datensätze wurden vier Gruppen gebildet, wobei als Selektionseinheit das einzelne Viertel verwendet wurde (s. Abbildung 22). Die Kriterien der Gruppeneinteilung anhand der Zellzahl sind der Tabelle 66 zu entnehmen.

Tabelle 66: Einteilung der Gruppen V1 bis V4 auf Basis der Zellzahl im VAG		
Gruppe	n	Zellzahl / ml Milch
V1	77	< 50.000
V2	18	50.000 – 100.000
V3	22	> 100.000 – 200.000
V4	50	> 200.000

n: Stichprobengröße (Viertel)

4.6.1.1 Korrelationen

4.6.1.1.1 Eutergesundheit

In Tabelle 67 sind die Korrelationskoeffizienten zwischen der Zellzahl im VAG und den erhobenen Parametern der Zelldifferenzierung sowie der Zellfunktionalität aus Milchproben dargestellt.

Tabelle 67: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Milchproben zu log SCC im VAG		
Parameter	Stichprobengröße	k
elektrische Leitfähigkeit	163	0,37
PMN M	170	0,69
Lymphozyten M	170	-0,68
Makrophagen M	170	-0,31
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN M	167	0,49
log Max	167	0,72
Time	167	-0,77
log CL-Aktivität / ml Milch	163	0,90

Stichprobengröße: Viertel

4.6.1.1.2 Zelldifferentialbild in Milch

Korrelationen zwischen dem Anteil PMN in der Milchzellsuspension und den Parametern der CL-Aktivität aus Milchproben sind in Tabelle 68 ersichtlich.

Tabelle 68: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter aus Milchproben zum Anteil PMN in Milch

Parameter	Stichprobengröße	k
Lymphozyten M	171	-0,75
Makrophagen M	171	-0,69
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN M	167	0,36
log Max	167	0,67
Time	167	-0,67
log CL-Aktivität / ml Milch	163	0,73

Stichprobengröße: Viertel

4.6.1.1.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Korrelationen zwischen den Parametern der Zellfunktionalität von aus Milch gewonnenen Daten sind der Tabelle 69 zu entnehmen.

Tabelle 69: Korrelationskoeffizienten (k) verschiedener Parameter der Zellfunktionalität aus Milchproben zueinander

Parameter 1	Parameter 2	n	k
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	Log Max	168	0,57
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	Time	168	-0,44
CL-Einheiten / 1 Mio. PMN	log CL-Aktivität / ml Milch	163	0,65
log Max	Time	168	-0,66
log Max	log CL-Aktivität / ml Milch	163	0,85
Time	log CL-Aktivität / ml Milch	163	-0,74

n: Stichprobengröße (Viertel)

4.6.1.2 Gruppenvergleich

Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter aus Milch sind nach Gruppen in Tabelle 70 dargestellt, die Signifikanzen zwischen den Gruppen in Tabelle 71. Abbildung 23 gibt die CL-Aktivitäten aus Milch der vier Gruppen wieder.

4.6.1.2.1 Eutergesundheit

Die Zellzahl im VAG stieg von Gruppe V1 bis Gruppe V4 hochsignifikant an ($p < 0,001$).

4.6.1.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN in Milch wurde von 30,7 % in Gruppe V1 zu 76,3 % in Gruppe V4 hochsignifikant größer ($p < 0,001$). Die Anteile Lymphozyten und Makrophagen sanken von Gruppe V1 bis Gruppe V4 ab (von 30,5 auf 6,7 % bzw. von 30,9 auf 16,6 %).

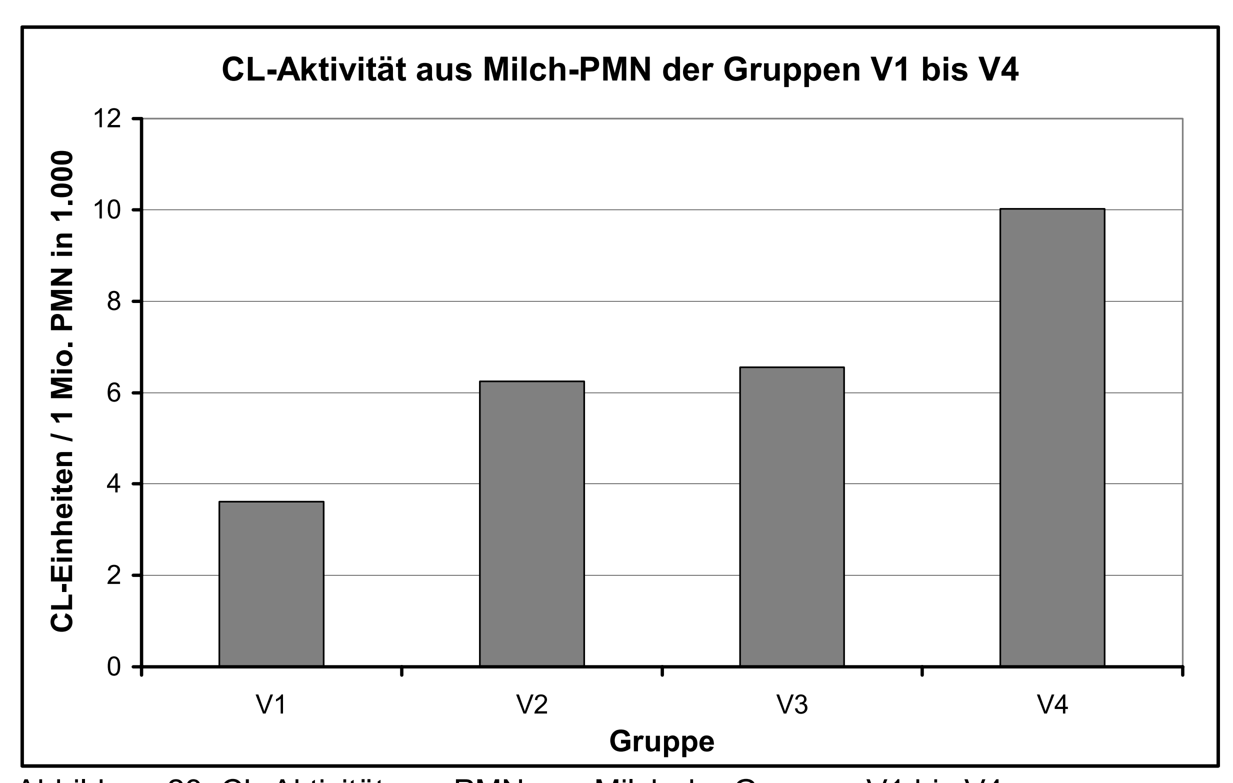


Abbildung 23: CL-Aktivität von PMN aus Milch der Gruppen V1 bis V4

Tabelle 70: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der Milchwerte der Gruppen V1 bis V4

Gruppe		log SCC	log LF	PMN M	Lym M	Makro M
V1	X	4,18	0,75	30,7	30,5	30,9
	± sd	0,38	0,04	19,2	20,2	20,4
	n	77	76	77	77	77
V2	X	4,83	0,77	49,8	16,8	31,2
	± sd	0,08	0,07	27,5	18,5	20,6
	n	18	15	18	18	18
V3	X	5,17	0,78	67,5	10,4	21,7
	± sd	0,09	0,08	20,9	8,8	15,8
	n	22	20	22	22	22
V4	X	5,76	0,81	76,3	6,7	16,6
	± sd	0,30	0,07	16,8	7,1	11,1
	n	50	49	50	50	50
Gruppe		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
V1	X	76,8	3.607	-1,61	2.147	0,66
	± sd	10,5	4.835	0,69	519	0,96
	n	77	77	74	74	73
V2	X	74,8	6.241	-1,14	1.667	1,80
	± sd	16,1	5.096	0,71	416	0,96
	n	18	18	18	18	18
V3	X	75,3	6.554	-0,70	1.418	2,49
	± sd	17,1	3.741	0,51	308	0,55
	n	22	22	22	22	22
V4	X	81,9	10.019	-0,33	1.095	3,42
	± sd	12,8	4.977	0,36	479	0,51
	n	50	50	50	50	50

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 71: Signifikanzen der Milchwerte zwischen den Gruppen V1 bis V4						
Gruppen		log SCC	log LF	PMN M	Lym M	Makro M
V1	V2	***	n. s.	*	*	n. s.
V1	V3	***	n. s.	***	***	n. s.
V1	V4	***	***	***	***	***
V2	V3	***	n. s.	*	n. s.	n. s.
V2	V4	***	n. s.	***	*	**
V3	V4	***	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
gesamt		***	***	***	***	***
Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
V1	V2	n. s.	*	*	***	***
V1	V3	n. s.	**	***	***	***
V1	V4	*	***	***	***	***
V2	V3	n. s.	n. s.	*	*	*
V2	V4	n. s.	**	***	***	***
V3	V4	n. s.	**	**	**	***
gesamt		n. s.	***	***	***	***

n. s.: nicht signifikant, p ≥ 0,05; *: p < 0,05;
**: p < 0,01; ***: p < 0,001

4.6.1.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Parameter CL-Aktivität Milch (10.019 Einheiten / 1 Mio. PMN), Max (-0,33) und log CL-Aktivität / ml Milch (3,42) hatten ihre Maxima in Gruppe V4, während der Parameter Time in dieser Gruppe mit 1.095 Sekunden den niedrigsten Mittelwert aufwies.

4.6.2 Gruppen auf Basis der CL-Aktivität M

Die Datenbank wurde nach der Höhe der CL-Aktivität M gruppiert (s. Abbildung 22). Hierfür wurden die drei Gruppen CL1, CL2 und CL3 gebildet, deren Selektionskriterien der Tabelle 72 zu entnehmen sind.

Tabelle 72: Einteilung der Gruppen CL1, CL2 und CL3 auf Basis der CL-Aktivität M

Gruppe	n	CL-Einheiten / 1 Mio. PMN
CL1	54	< 3.000
CL2	44	3.000 – 6.000
CL3	70	> 6.000

n: Stichprobengröße (Viertel)

Die Tabelle 73 stellt die Grunddaten der drei Gruppen dar. Eine graphische Darstellung der Zellzahl und der CL-Aktivitäten aus Blut und Milch findet sich in Abbildung 24. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind in Tabelle 74 wiedergegeben.

4.6.2.1 Eutergesundheit

Die Zellzahl im VAG stieg von Gruppe CL1 bis Gruppe CL3 hochsignifikant an (s. Tabelle 74).

4.6.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN in der Milch-Zellsuspension stieg von 33,1 (CL1) auf 68,0 % (CL3). Der höchste Anteil Makrophagen fand sich in der Gruppe CL2 mit 30,8 %.

Tabelle 73: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) von Milchwerten der Gruppen CL1 bis CL3

Gruppe		log SCC	log LF	PMN M	Lym M	Makro M
CL1	X	4,2	0,75	33,1	33,4	26,6
	± sd	0,5	0,03	22,0	22,2	21,4
	n	54	54	53	53	53
CL2	X	4,9	0,79	46,4	17,1	30,8
	± sd	0,6	0,09	24,0	12,8	16,8
	n	44	39	44	44	44
CL3	X	5,4	0,79	68,0	9,9	21,3
	± sd	0,5	0,06	25,7	12,5	16,5
	n	69	67	70	70	70
Gruppe		**Vitalität**	**CL-Aktivität M**	**log Max**	**Time**	**log CL-Aktivität / ml Milch**
CL1	X	71,1	1.104	-1,84	2.214	0,23
	± sd	13,2	912	0,65	584	0,92
	n	54	54	51	51	50
CL2	X	80,0	4.510	-1,04	1.666	2,01
	± sd	10,4	788	0,47	515	0,77
	n	44	44	44	44	44
CL3	X	82,0	11.232	-0,46	1.304	3,05
	± sd	12,4	4.834	0,54	521	0,82
	n	70	70	70	70	69

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 74: Signifikanzen der Milchwerte zwischen den Gruppen CL1, CL2 und CL3						
Gruppen		log SCC	log LF	PMN M	Lym M	Makro M
CL1	CL2	***	*	**	***	n. s.
CL1	CL3	***	***	***	***	n. s.
CL2	CL3	***	n. s.	***	**	**
Allgemein		***	**	***	***	*
Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
CL1	CL2	***	***	***	***	***
CL1	CL3	***	***	***	***	***
CL2	CL3	n. s.	***	***	***	***
Allgemein		***	***	***	***	***

n. s.: nicht signifikant, p ≥ 0,05; *: p < 0,05;
**: p < 0,01; ***: p < 0,001

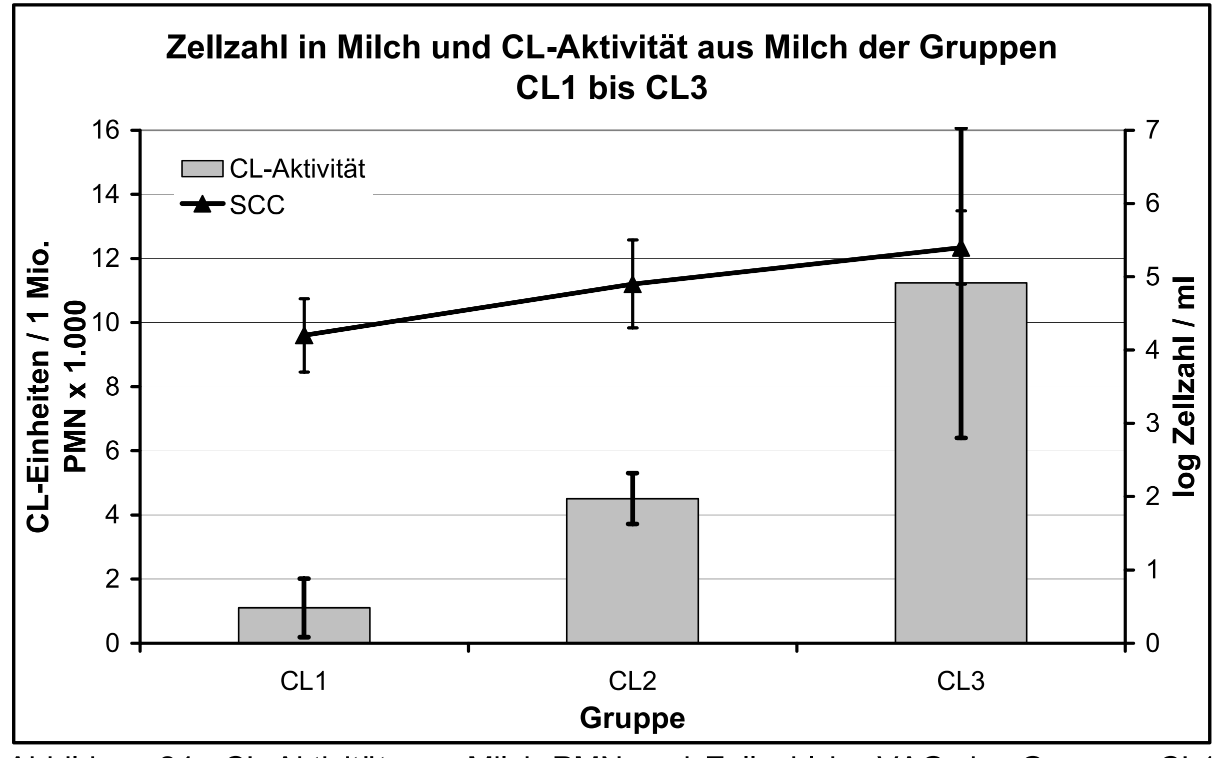


Abbildung 24: CL-Aktivität aus Milch-PMN und Zellzahl im VAG der Gruppen CL1 bis CL3

4.6.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Vitalität war in Gruppe CL1 (71,1 %) signifikant niedriger als in den anderen Gruppen. Die Werte der Parameter log Max und log CL-Aktivität / ml Milch stiegen von Gruppe zu Gruppe hochsignifikant an ($p < 0,001$), für den Parameter Time war ein entsprechender Abfall der Werte zu beobachten (2.214 Sekunden in Gruppe CL1, 1.304 Sekunden in Gruppe CL3).

4.6.2.4 Auswertung der Gruppe CL2 anhand der Zellzahl (Gruppen CL2/T<100, CL2/V<100 und CL2/V>100)

Um einen engeren Zusammenhang der CL-Aktivität zur Eutergesundheit herzustellen, und um der Abhängigkeit der Euterviertel einer Kuh voneinander Rechnung zu tragen, wurde die Gruppe CL2 erneut kategorisiert. Die Kriterien für die Einteilung der Gruppen CL2/T<100, CL2/V<100 und CL2/V>100 sind der Tabelle 75 zu entnehmen. Dabei enthält die Gruppe CL2/T<100 Daten von Tieren, die auf allen Vierteln Zellzahlen unter 100.000 Zellen / ml Milch aufweisen. Die Daten der beiden anderen Gruppen wurden jedoch auf Viertelebene selektiert.

Tabelle 75: Einteilung der Gruppe CL2 in die Gruppen CL2/T<100, CL2/V<100 und CL2/V>100

Gruppe	n	Zellzahl / ml Milch	Selektionsebene
CL2/T<100	15	< 100.000	Tier
CL2/V<100	10	< 100.000	Viertel
CL2/V>100	14	≥ 100.000	Viertel

n: Stichprobengröße (Viertel)

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter innerhalb der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 76 dargestellt. Tabelle 77 legt die Signifikanzen zwischen den drei Gruppen dar.

Tabelle 76: Mittelwerte (X) und Standardabweichungen (sd) der Milchwerte der Gruppen CL2/T<100, CL2/V<100 und CL2/V>100

Gruppe		log SCC	log LF	PMN M	Lym M	Makro M
CL2/T<100	X	4,45	0,77	24,6	22,8	38,0
	± sd	0,27	0,07	12,8	17,5	20,6
	n	15	15	15	15	15
CL2/V<100	X	4,61	0,77	54,7	15,4	26,9
	± sd	0,31	0,03	17,8	8,6	8,3
	n	10	6	10	10	10
CL2/V>100	X	5,49	0,83	65,5	12,0	22,6
	± sd	0,39	0,12	17,1	8,7	11,9
	n	14	13	14	14	14
Gruppe		**Vitalität**	**CL-Aktivität M**	**log Max**	**Time**	**log CL-Aktivität / ml Milch**
CL2/T<100	X	80,1	4.630	-1,28	1.858	1,34
	± sd	9,3	760	0,60	350	0,39
	n	15	15	15	15	15
CL2/V<100	X	82,5	4.361	-1,12	1.795	1,87
	± sd	5,8	841	0,43	567	0,45
	n	10	10	10	10	10
CL2/V>100	X	77,9	4.303	-0,74	1.382	2,80
	± sd	14,1	814	0,15	481	0,44
	n	14	14	14	14	14

n: Stichprobengröße (Viertel)

Tabelle 77: Signifikanzen der Milchwerte zwischen den Gruppen CL2/T<100, CL2/V<100 und CL2/V>100

Gruppen		log SCC	log LF	PMN M	Lym M	Makro M
CL2/T<100	CL2/V<100	n. s.	n. s.	***	n. s.	n. s.
CL2/T<100	CL2/V>100	***	n. s.	***	*	*
CL2/V<100	CL2/V>100	***	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Allgemein		***	n. s.	***	n. s.	*

Gruppen		Vitalität	CL-Aktivität M	log Max	Time	log CL-Aktivität / ml Milch
CL2/T<100	CL2/V<100	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	**
CL2/T<100	CL2/V>100	n. s.	n. s.	**	**	***
CL2/V<100	CL2/V>100	n. s.	n. s.	*	n. s.	***
Allgemein		n. s.	n. s.	**	*	***

n. s.: nicht signifikant, $p \geq 0,05$; *: $p < 0,05$;
**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.6.2.4.1 Eutergesundheit

Leitfähigkeit und Zellzahl im VAG lagen in der Gruppe CL2/V>100 signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,001$).

4.6.2.4.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN in der Zellsuspension Milch stieg von Gruppe CL2/T<100 bis Gruppe CL2/V>100 stetig an. Zwischen Gruppe CL2/T<100 (24,6 %) und Gruppe CL2/V<100 (54,7 %) lag ein hochsignifikanter Unterschied vor (s. Tabelle 77).

4.6.2.4.3 Zellfunktionalität in Milch

Log Max und log CL-Aktivität / ml Milch wurden mit steigender Gruppenzahl größer.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, das mikroskopische Differentialzellbild aus Milch sowie die Parameter der Zellfunktionalität aus Blut und Milch im Zusammenhang mit den Parametern Zellzahl, elektrische Leitfähigkeit und NAGase zu vergleichen. Zunächst mussten die Methoden der funktionellen Untersuchungen an die Besonderheiten der aus Milch isolierten Zellen angepasst werden. Nach der Beurteilung der methodischen Versuche werden die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen diskutiert.

5.1 Methodische Versuche zur Phagozytoseaktivität in Blut

5.1.1 Inkubationszeit

Die Inkubationszeiten von 30, 60 und 90 Minuten der mit Bakterien versetzten Blutzellsuspensionen wurden miteinander verglichen (s. Abschnitt 4.1.1). Da die Anteile aktiver Zellen der Proben n (z. B. von 8,3 % auf 18,6 % für Tier A) und o (z. B. von 24,0 % auf 79,8 % für Tier A) sowie die MFI der Proben o (z. B. von 90,1 auf 226,5 für Tier A) kontinuierlich anstiegen, wurde die Inkubationszeit von 60 Minuten, die der Arbeitsanweisung der Arbeitsgruppe Immunologie entspricht, beibehalten. In der Literatur werden Angaben zur Inkubationszeit von 15 (SAAD u. HAGELTORN 1985) bis 90 Minuten (WILLIAMS et al. 1985) genannt.

5.1.2 Zellkonzentration

Die Zellkonzentrationen 4 Mio., 2 Mio. und 200.000 Zellen / ml Blutzellsuspension wurden einem Vergleich unterzogen (s. Abschnitt 4.1.2). Mit sinkender Zellkonzentration stieg der Anteil phagozytierender Zellen in den Proben n an (z. B. von 10,3 auf 29,4 % für Tier A). Zwischen den Werten der Proben n und o war ein deutlicher Un-

terschied erwünscht, der in Ansatz c (200.000 Zellen / ml) geringer als in den anderen Proben war. Unter Berücksichtigung niedrigzelliger Milchproben sollte der Verbrauch an Probenmaterial allerdings eingeschränkt werden. Die Zellkonzentration in der Zellsuspension wurde daher auf 2 Mio. Zellen / ml festgelegt, was ebenfalls mit den Angaben aus der Arbeitsanweisung der Arbeitsgruppe Immunologie übereinstimmt. In der Literatur sind Zellkonzentrationen von 1 (SORDILLO u. BABIUK 1991) bis 25 Mio. Zellen / ml (PAAPE et al. 1975) zu finden.

5.1.3 Bakterienkonzentration

Zwei Ansätze aus Blut-PMN mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen (0,15 x 10^8/ml bzw. 0,7 x 10^8/ml) wurden einander gegenübergestellt (s. Abschnitt 4.1.3). Auch hier war ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben n und o erwünscht. Zudem musste der Tatsache Rechnung getragen werden, dass einige Zellsuspensionen aus Milch weniger Zellen enthielten als die Zellsuspensionen aus Blut. Um einen Überschuss an Bakterien in allen Proben zu sichern wurde eine Bakterienkonzentration von 0,7 x 10^8 Bakterien / ml eingesetzt. Andere Autoren setzten zwischen 6 x 10^6 Bakterien / ml (WILLIAMS et al. 1985) und 5 x 10^8 Bakterien / ml (SAAD u. HAGELTORN 1985) ein.

5.1.4 Zusammenfassende Beurteilung

Die Phagozytosemessung wurde in den weiteren Versuchen mit 2 x 10^6 Zellen / ml sowie 0,7 x 10^8 Bakterien / ml unter Einhaltung einer Inkubationszeit von 60 Minuten durchgeführt. In Tabelle 78 wird diese Methode der Arbeitsanweisung der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover gegenübergestellt.

Tabelle 78: Methodenvergleich Phagozytosebestimmung Immunologie – Merle		
Parameter	Immunologie	Merle
Inkubation	60 Minuten	60 Minuten
Zellkonzentration	2×10^6 Zellen / ml	2×10^6 Zellen / ml
Bakterienkonzentration	$0{,}15 \times 10^8$ Bakterien / ml	$0{,}7 \times 10^8$ Bakterien / ml

5.2 Methodische Versuche zur CL-Aktivität in Blut

5.2.1 Zellisolierung bei verschiedenen Temperaturen

Blut-PMN wurden bei 0° C (Gruppe 1) bzw. bei 25° C (Gruppe 2, s. Abschnitt 4.2.1) isoliert und hinsichtlich ihrer CL-Aktivität untersucht. Dabei hatten drei von vier Tieren nach der Aufbereitung mit 0° C höhere Ergebnisse als mit 25° C. Auch der Variationskoeffizient war in Gruppe 1 (24,8 %) niedriger als in Gruppe 2 (33,0 %). Zudem wurde die unerwünschte Aggregatbildung der PMN verstärkt in den Proben der Gruppe 2 beobachtet. In Übereinstimmung mit den Angaben aus der Literatur (z.B. PAAPE et al. 1975; WEBER et al. 1983; MEHRZAD 2002) wurde die Zellisolation im Weiteren auf Eis durchgeführt.

5.2.2 Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Der Einfluss einer Inkubation der Blutzellsuspension vor der Messung bei 0° C, 25° C und 38° C auf die CL-Aktivität wurde untersucht (s. Abschnitt 4.2.2). Der mittlere Variationskoeffizient zwischen den Ergebnissen von Tag 1 bis Tag 5 lag in Ansatz 1 (0° C) mit 26,9 % am niedrigsten.

Der erste Messwert der 30 Einzelwerte (s. Abschnitt 3.7.7) der CL-Messung soll 0 betragen, um sicherzustellen, dass die Sauerstoffradikale erst nach Beginn der Mes-

sung ausgeschüttet werden. Die Ansätze 3 (38° C) wiesen oft Werte über 0 auf, wodurch die Standardisierung der Messung behindert wurde.

Für die weiteren Versuche wurden die Zellsuspensionen bis zum Beginn der Messung auf Eis gelagert. MEHRZAD (2002), der ebenfalls mit einem Luminometer arbeitete, bewahrte die isolierten Zellen bis zur Messung auf Eis auf. Da HOEBEN (1999) in seinen Untersuchungen statt des Luminometers ein Szintillationsspektrometer einsetzte, gab er eine optimale Inkubationstemperatur von 26° C an.

5.2.3 Lagerungsdauer der Proben

Die CL-Aktivität und die Vitalität von vier Blutzellsuspensionen wurden innerhalb von 24 Stunden mehrmals bestimmt (s. Abschnitt 4.2.3). Zwischen 0 und 6 Stunden stiegen die Werte der CL-Aktivität für die kranken Tieren an, während sie für die gesunden Tieren abfielen. Dem Anstieg kann eine vorausgegangene Behandlung der Tiere mit Antibiotika zugrunde liegen, die die Zellaktivität beeinflussen (HOEBEN 1999). Eine längere Lagerungsdauer führte in allen Blutproben zu einem Abfall der CL-Aktivität und der Vitalität. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass eine kurzfristige Lagerung der Zellsuspensionen auf Eis nach Abschluss der Zellisolation die Messung der CL-Aktivität nicht beeinflusst, eine Lagerungsdauer über sechs Stunden jedoch zu vermeiden ist. HOEBEN (1999) stellte in vergleichbaren Untersuchungen fest, dass eine Inkubationszeit isolierter PMN (4° C) von einer Stunde optimal ist und drei Stunden nicht überschreiten sollte.

5.2.4 Zellkonzentration

Die CL-Aktivität verschiedener Zellkonzentrationen aus Blut-PMN wurde bestimmt und miteinander verglichen (s. Abschnitt 4.2.4). Die Anzahl vitaler PMN in der Zellsuspension und die CL-Aktivität korrelierten stark miteinander (k = 0,97 – 0,99). Die CL-Aktivität stieg demnach linear zur Zellzahl in der Probe an (s. Abbildung 7), sodass die genaue Einhaltung einer bestimmten Zellkonzentration in den Zellsuspensionen nicht erforderlich war. Die Präzision des Blutanalysegerätes Hematology Ana-

lyser, mit dem die Zellkonzentration bestimmt wurde, ist im Bereich zwischen 2 und 10 x 10^6 Zellen mit einem Variationskoeffizienten unter 0,5 % am höchsten. Festgelegt wurde daher eine Zellkonzentration von 4 x 10^6 / ml. Die Angaben aus der Literatur reichen von 0,5 – 2,5 x 10^6 (MEHRZAD 2002) bis 5 x 10^7 (KREMER et al. 1993) Zellen / ml. Für Milch liegt nach MEHRZAD (2002) die optimale Zellkonzentration zwischen 0,25 und 4 x 10^6 / ml.

5.2.5 PMA-Konzentration

Der Einsatz verschiedener PMA-Konzentrationen (375, 750 und 1.500 ng / ml) für die Messung der CL-Aktivität aus Blutzellsuspensionen (s. Abschnitt 4.2.5) zeigte eine deutliche Korrelation zwischen der Konzentration PMA in der Probe und der Höhe der CL-Aktivität ($k > 0{,}78$ in 7 von 12 Probensätzen). Die graphische Darstellung machte jedoch deutlich, dass es sich nicht um einen kontinuierlichen Anstieg handelte. Offensichtlich war das Anregungspotential der PMN mit 750 ng / ml nahezu ausgeschöpft, da zwischen 750 ng / ml und 1500 ng / ml nur noch ein geringer Anstieg der CL-Aktivität zu verzeichnen war. Auch der Variationskoeffizient lag für 750 ng / ml mit 22,2 % am niedrigsten. Daher wurde eine PMA-Konzentration von 750 ng / ml festgelegt.

Nach MEHRZAD (2002) liegt die optimale PMA-Konzentration mit 100 bis 500 ng / ml für PMN aus Blut niedriger. Die größeren Variationen zwischen den Proben in diesem Bereich beruhen auf der individuellen Sensibilität der PMN gegenüber PMA. Dadurch wirken sich geringste Schwankungen in der PMA-Konzentration auf das Ergebnis aus. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Menge an PMA aktiviert alle Zellen maximal, sodass die unvermeidbaren geringen Schwankungen wenig Einfluss auf das Ergebnis haben.

5.2.6 pH-Wert

Da die Luminol-Reaktion nur im alkalischen Milieu abläuft (BROLIN u. WETTERMARK 1992), wurde der Einfluss der pH-Wertes auf die Messung der CL-Aktivität

aus Blutzellsuspensionen untersucht (s. Abschnitt 4.2.6). Die Messungen mit einem pH-Wert von 10,8 ergaben etwa 10fach höhere Werte als die Messungen mit pH 7,1. Die Variationskoeffizienten der Ergebnisse eines Tieres von mehreren Tagen waren mit einem pH-Wert von 10,8 durchgehend niedriger als die entsprechenden Variationskoeffizienten mit pH 7,1. Die folgenden Versuche wurden mit dem pH-Wert von 10,8 durchgeführt. MEHRZAD (2002) führte seine CL-Messungen mit pH 7,2 durch.

5.2.7 Messung der CL-Aktivität aus Vollblut, lysiertem Blut und aufbereiteter Zellsuspension

Die Ergebnisse von drei verschiedenen Probenarten wurden miteinander verglichen: Vollblutproben (a), lysierte Proben (b) und isolierte PMN (c) (s. Abschnitt 4.2.7). Aus Vollblutproben konnte keine CL-Aktivität gemessen werden, auch wenn NAGAHATA et al. (1988) dies gelungen war. Die Ergebnisse der lysierten Proben und der isolierten PMN korrelierten miteinander, die Werte der isolierten PMN waren jedoch etwas höher als die der lysierten Proben. Dies erklärt sich dadurch, dass sich vorhandene Lymphozyten an der Oberfläche der Probe aufhielten und durch ihr Volumen die Freisetzung und Detektion des Lichtes im Luminometer behinderten. Im Konsens mit anderen Untersuchern (z. B. HOEBEN et al. 2000a, 2000b; MEHRZAD 2002) wurde die Isolation der PMN daher weiterhin durchgeführt.

5.2.8 Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages

Die Wiederholbarkeit der CL-Aktivitätsmessung aus Blut-PMN innerhalb eines Tages wurde überprüft (s. Abschnitt 4.2.8). Der Variationskoeffizient aus den beiden Arbeitslösungen derselben Probe (z. B. Proben 1a und 1b) betrug im Mittel 4,7 %. Diesen Schwankungen lagen das Auftragen der Proben in die Mikrotiterplatte und die Messungenauigkeit des Luminometers zugrunde. Technische Schwankungen einer Methode von 5 bis 10 % können als akzeptabel bezeichnet werden. MEHRZAD (2002) ermittelte in einer gleichartigen Untersuchung einen Variationskoeffizienten von 4,3 %.

Der mittlere Variationskoeffizient aus den vier Arbeitslösungen desselben Tieres (z. B. Proben 1a, 1b, 2a und 2b) lag mit 10,5 % mehr als doppelt so hoch. Die Ursachen für diese Schwankungen waren in der Technik der Zellisolierung und ebenfalls in der Durchführung der Messung zu finden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Vorgang der Zellseparation ebenso großen Einfluss auf das Ergebnis nahm wie die Messung selbst. Es gilt daher, die Isolation der PMN so gleichmäßig wie möglich durchzuführen.

5.2.9 Zusammenfassende Beurteilung

Die laboranalytischen Vorarbeiten zur Standardisierung der Untersuchung von Blutproben führten zu folgenden Modifikationen der bisher etablierten Methoden: Die Zellen wurden bei 0° C separiert, anschließend wurden die Proben zwischen 1 und 3 Stunden auf Eis gelagert. Die Messung wurde mit einer Zellkonzentration von 4 x 10^6 Zellen / ml, 750 ng PMA / ml sowie einem pH-Wert von 10,0 in der Reaktionslösung durchgeführt. Dieses Verfahren kann als hinreichend reproduzierbar angesehen werden. Abgesehen von der PMA-Konzentration und von pH-Wert fügt sich die Vorgehensweise in die Angaben aus der Literatur ein. Ein Vergleich zwischen dem methodischen Vorgehen und Angaben von MEHRZAD (2002) findet sich in Tabelle 79.

Tabelle 79: Methodenvergleich CL-Aktivität nach MEHRZAD (2002) und nach Merle

Parameter	Mehrzad	Merle
Zellisolierung	Eis	Eis
Inkubation	Eis	Eis
Lagerung	0 – 3 Stunden	1 – 6 Stunden
Zellkonzentration	0,5 – 2,5 x 10^6 Zellen / ml	4 x 10^6 Zellen / ml
PMA-Konzentration	100 – 500 ng / ml	750 ng / ml
pH-Wert	7,2	10,0
Wiederholbarkeit	4,3 %	4,7 %

5.3 Versuch 1: Einfluss der Zahl der erkrankten Euterviertel pro Kuh auf die Zellfunktionalität von PMN aus Milch und Blut

5.3.1 Blutproben

5.3.1.1 Vollblutuntersuchungen

Liegt eine Entzündung im Körper vor, so steigt mit der Zahl der Leukozyten (WBC) auch der Anteil PMN im Blut (KRAFT u. DÜRR 1997). In der vorliegenden Untersuchung korrelierten beide Parameter erwartungsgemäß miteinander (k = 0,64).

Eine Darstellung der Gruppenstruktur findet sich in Abbildung 9 (Abschnitt 4.3.1). Der Anteil PMN in Gruppe C lag mit 54,6 % oberhalb des Grenzwertes von 50 % (KRAFT u. DÜRR 1997), die Leukozytenzahl (WBC) blieb in dieser Gruppe mit 9,7 Mio. Zellen / ml noch im Referenzbereich von 4 – 10 Mio. Zellen / ml (KRAFT u. DÜRR 1997). Während die Tiere der Gruppen A und B allgemeingesund waren, wies der Anstieg beider Parameter in Gruppe C auf ein Krankheitsgeschehen hin (KRAFT u. DÜRR 1997). REDETZKY (2000) konnte in Untersuchungen mit einer höheren Stichprobengröße (n = 42 Tiere) ebenfalls einen tendenziellen Anstieg der Leukozytenzahl im Blut im Zusammenhang mit klinischen Mastitiden feststellen.

5.3.1.2 Zellfunktionalität in Blut

Die Parameter der Zellfunktionalität aus Blut-PMN zeigten keine Korrelationen zum Anteil PMN in Blut. Beiden Parametern scheinen unterschiedliche Aktivierungsmechanismen zugrunde zu liegen. Innerhalb der Parameter der Zellfunktionalität korrelierten lediglich log Max und die CL-Einheiten / 1 Mio. PMN aus Blut miteinander (k = 0,81). Diese Korrelation beschreibt die Abhängigkeit des aus 30 Einzelmessungen gebildeten Integrals, aus dem die CL-Einheiten / 1 Mio. PMN berechnet werden, vom Maximum der Kurve. Die hohe Übereinstimmung beider Parameter drückt aus, dass der Kurvenverlauf in allen Proben ähnlich war. Obwohl auch HOEBEN (1999) in

seinen Untersuchungen die Parameter Max, Time und das Integral der Kurve (CL-Einheiten / 1 Mio. PMN) aus der CL-Messung im Blut erhob, gab er keine Korrelationen zwischen diesen Parametern an.

Die hohe Phagozytoseaktivität in Gruppe B (42,3 % der Proben n; 45,1 % der Proben o) deutete auf eine Aktivierung des Immunsystems hin, die auch von DALEY et al. (1991) beobachtet wurde. In Gruppe C (32,9 % der Proben n; 39,0 % der Proben o) war die Phagozytosekapazität vermutlich deshalb besonders niedrig, da es sich um allgemeinerkrankte Tiere mit einem geschwächten Immunsystem handelte. Eine Erkrankung aller vier Euterviertel gleichzeitig ist äußerst selten und unterstützt diese Annahme.

Die CL-Aktivität lag in den Gruppen B und C tendenziell niedriger als in Gruppe A. Dies kann auf einen krankheitsbedingt erhöhten Anteil stabkerniger PMN im Blut zurückgeführt werden, von denen aufgrund mangelnder Reife nur ca. 57 % zum Respiratory Burst befähigt sind (GLASSER u. FIEDERLEIN 1987). Es ist aber auch denkbar, dass diese Tiere z. B. aufgrund chronischer Infektionen eine grundsätzlich inaktivere Abwehrlage besaßen.

5.3.2 Milchproben

5.3.2.1 Eutergesundheit

Die elektrische Leitfähigkeit in Milchproben gesunder Euterviertel liegt nach HAMANN und FEHLINGS (2002) zwischen 4,8 und 6,2 mS / cm. Vermutlich aufgrund der geringeren Stichprobenzahl korrelierte dieser Parameter stärker mit der Zellzahl in Milch (k = 0,65) als von GRABOWSKI (2000) angegeben (k = 0,30). Log SCC in Milch weist einen Modalwert von 20.000 Zellen / ml (log 4,30) bis 50.000 Zellen / ml (log 4,70) mit der doppelten Standardabweichung bis 100.000 Zellen / ml (log 5,00) auf (DOGGWEILER u. HESS 1983; HAMANN u. REICHMUTH 1990). Die Anzahl somatischer Zellen wird allgemein dahingehend interpretiert, dass eine entzündliche Reaktion oberhalb der Grenzwertes von 100.000 Zellen / ml Milch beginnt (REICHMUTH 1975; HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Die Tiere der Gruppe A wurden anhand dieser Parameter als eutergesund bezeichnet (s. Tabelle 80). Anhand der Gruppenstruktur (Tiere mit SCC über 100.000 Zellen / ml Milch in 1 bis 3 Vierteln) konnten die Tiere der Gruppe B ebenfalls als erkrankt definiert werden. Die Tiere der Gruppe C waren nach diesen Richtlinien euterkrank.

Tabelle 80: Beurteilung der Eutergesundheit der Tiere in den Gruppen A, B und C anhand der Parameter SCC und elektrische Leitfähigkeit

Parameter	Referenzbereich*	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 16.600 log 4,22	100.000 log 5,00	ca. 800.000 log 5,90
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,43	6,06	6,62
Beurteilung		eutergesund	euterkrank**	euterkrank

*: Referenzwerte nach HAMANN u. FEHLINGS (2002)

**: Begründung für diese Beurteilung s. Text

5.3.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Die Korrelationskoeffizienten der Anteile PMN und Lymphozyten in der Milchzellsuspension zur Zellzahl in Milch waren mit k = 0,59 bzw. -0,61 gegensinnig, aber gleich hoch. Die Tatsache, dass mit steigendem SCC in der Milch auch der Anteil PMN in der Zellsuspension zunimmt, wurde bereits wiederholt festgestellt (z. B. PAAPE et al. 1981a; KURZHALS et al. 1985; CONCHA 1986; LEITNER et al. 1995; SCHRÖDER 2003). Wie die Zellzahl dient auch ein erhöhter Anteil PMN als Ausdruck eines infektiösen Geschehens im Euter.

Das Differentialzellbild der Gruppe A mit 41,9 % PMN, 27,7 % Lymphozyten und 25,5 % Makrophagen wies im Vergleich zu veröffentlichten Daten einen hohen PMN-Anteil auf (z. B. WEVER u. EMANUELSON 1989; DOSOGNE et al. 2003; SCHRÖDER 2003; s. Abschnitt 2.2.2). Aufgrund der geringen Stichprobenzahl und im Ver-

gleich zu den Ergebnissen der Gruppen B und C wurde dennoch davon ausgegangen, dass in Gruppe A die Tiere eutergesund waren.

Die Zelldifferentialbilder der Tiere der Gruppen B (65,2 % PMN) und C (83,9 % PMN) sprachen für das Vorliegen einer Euterinfektion. Vermutlich war die Tatsache, dass in Gruppe B viele der Tiere chronische Infektionen aufwiesen, verantwortlich für das Zelldifferentialbild in dieser Gruppe, da chronische Infektionen im Vergleich zu akuten durch einen höheren Lymphozyten- und Makrophagenanteil gekennzeichnet sind (CONCHA 1986; KRAFT u. DÜRR 1997). Eine getrennte Betrachtung der erkrankten sowie der nicht erkrankten Euterviertel würde weitere Informationen über das Krankheitsbild liefern. Gruppe C erreichte beinahe den Wert von 90 % PMN, der in der Literatur für akute Mastitiden häufig angegeben wird (z. B. PAAPE et al. 1979) und erklärt auch den erhöhten PMN-Anteil im Blut.

5.3.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Prozentsatz und MFI der opsonisierten Proben korrelierten negativ mit der Zellzahl in Milch (k = -0,68 für beide Parameter) und dem Anteil PMN in Milch (k = -0,57 bzw. -0,84). Höhere Zellzahlen in Milch führten offensichtlich zu einer verminderten Aktivität der Zellen.

Entsprechend dieser Korrelationen war für die Milchwerte wie schon für die Blutwerte (s. Abschnitt 5.3.1.2) die niedrigste Phagozytoseaktivität in Gruppe C zu finden. Dies steht im Widerspruch zu anderen Veröffentlichungen (z. B. DALEY et al. 1991). Die niedrigere Phagozytoseaktivität trotz hohem PMN-Anteil in der Zellsuspension führt zu der Annahme, dass beide Parameter durch unterschiedliche immunologische Vorgänge gesteuert werden. Die Tiere der Gruppe C waren vermutlich immungeschwächt, da sie auch in Blut erhöhte Leukozytenzahlen sowie eine herabgesetzte Phagozytoseaktivität hatten und offensichtlich besonders infektionsanfällig waren.

Unter den Parametern der CL-Aktivität war besonders log CL-Aktivität / ml Milch eng mit der Zellzahl (k = 0,89) und dem Anteil PMN in der Milchzellsuspension (k = 0,80) korreliert. Dieser Wert führt die Parameter Zellzahl in Milch, Anteil und Vitalität der PMN in der Milchzellsuspension sowie die CL-Aktivität / 1 Mio. PMN zusammen, so-

dass die hohen Korrelationen den Erwartungen entsprachen. Auch von LILIUS und PESONEN (1990) wurde schon festgestellt, dass die CL-Aktivität von Milchzellen zellzahlabhängig steigt. Aber auch eine positive Korrelation zwischen dem PMN-Anteil und der CL-Aktivität wurde bereits belegt (MEHRZAD 2002).

Die Parameter der CL-Aktivität aus Milchzellen korrelierten erwartungsgemäß untereinander deutlich (k = -0,60 oder kleiner bzw. 0,66 oder größer). Zwischen der CL-Aktivität M und den Parametern zur Beschreibung der Phagozytose bestanden, wie auch von WILLIAMS et al. (1985) beschrieben, keine signifikanten Korrelationen. Auch hier scheinen jeweils unterschiedliche Mechanismen für die Aktivierung verantwortlich zu sein.

In Gruppe A wies die CL-Aktivität im Gegensatz zur Phagozytose die niedrigsten Mittelwerte auf. Besonders deutlich wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen für den Parameter CL-Aktivität / ml Milch ($p < 0,01$). Dies hat seine Ursachen darin, dass in der Milch gesunder Euterviertel andere immunmodulatorische Stoffe vorliegen als in Milch infizierter Viertel (RIOLLET et al. 2000). Die geringere Zellzahl in der Milch gesunder Viertel hat zur Folge, dass die Zellen länger in der Milch verweilen und ihre Aktivität durch sinkende Energiereserven (Glykogenspeicher) nach und nach verlieren (NEWBOULD 1970, 1973). Anhand der Untersuchungen zur Vitalität von Zellen aus Blut und Milch konnte MEHRZAD (2002) eine niedrige Vitalität von Zellen aus Milch mit geringer Zellzahl feststellen.

5.3.3 Zusammenfassende Beurteilung

Ziel der Untersuchungen war es, die Aktivität der aus Blut gewonnenen PMN mit Parametern der Eutergesundheit und der Zellfunktionalität aus Milch in Zusammenhang zu bringen. Dazu wurden gezielt Tiere, die auf allen vier Eutervierteln erkrankt waren, mit Tieren, die auf einem bis drei Vierteln erkrankt waren, sowie mit gesunden Tieren verglichen.

Die Auswertung der Daten bestätigte, dass die Tiere der Gruppe A gesund und die der Gruppe B auf einem bis drei Vierteln euterkrank waren. Die Allgemeingesundheit

dieser Tiere war nicht beeinträchtigt, während die Tiere der Gruppe C sowohl allgemein- als auch euterkrank waren. Da alle vier Euterviertel gleichzeitig erkrankt waren, die Leukozytenzahl sowie der Anteil PMN im Vollblut erhöht, die funktionellen Zelleigenschaften in Blut sowie in Milch jedoch herabgesetzt waren, handelte es sich vermutlich um immundefiziente Tiere. Die aus Blut gewonnenen Daten unterschieden sich allerdings nicht signifikant ($p \geq 0,05$) von denen der Gruppen A und B. Die Aussagekraft der Funktionalitätsbestimmung von Blut-PMN blieb demnach darauf beschränkt, den allgemeinen Gesundheits- und Abwehrstatus der Kuh zu beschreiben. Die häufig auftretende subklinische Erkrankung eines Euterviertels verursacht keine signifikanten Änderungen der untersuchten Blutparameter.

HOEBEN (1999), der die Eutergesundheit anhand der Chemilumineszenz aus Blut-PMN beurteilte, untersuchte lediglich den Zeitraum von 4 Tagen vor bis 9 Tagen nach einer experimentellen Infektion und stellte Unterschiede in der Blutzellaktivität fest. Die stichprobenartige Struktur der vorliegenden Studie ließ solche Beobachtungen nicht zu, da der Infektionsbeginn nicht bekannt war.

Die Milchparameter der Tiere, die auf einem bis drei Vierteln erkrankt waren, unterschieden sich von den Kühen, die auf allen vier Eutervierteln erkrankt waren. Dies führt zu dem Schluss, dass auf funktioneller Ebene eine einfache Unterteilung der Tiere in „gesund“ und „krank“ nicht ausreicht, den Eutergesundheitszustand zu beschreiben. Vielmehr stellen Entzündungsvorgänge ein komplexes System immunologischer Reaktionen dar, das genauerer Untersuchungen insbesondere des Übergangsbereiches zwischen gesund und krank bedarf.

5.4 Versuch 2: Verlaufsuntersuchung

5.4.1 Eutergesunde Tiere

5.4.1.1 Zellzahl im VAG

In den ersten drei Laktationswochen lagen die Zellzahlen in der Milch der drei eutergesunden Tiere über dem Niveau der übrigen Wochen. Der Wert von 100.000 Zellen / ml Milch, der als Grenzwert für die Gesundheit eines Euterviertels gilt (HAMANN u. FEHLINGS 2002), wurde jedoch nur in der Standardabweichung von Woche W1 überschritten. Hohe Zellzahlen zu Beginn der Laktation wurden von anderen Autoren festgestellt (REICHMUTH 1975; GRABOWSKI 2000) und sind in der Kolostralmilchphase physiologisch bedingt (GRABOWSKI et al. 2002).

5.4.1.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN in der Milchzellsuspension lag stets unter 40 %. Dies stimmte mit den Angaben einiger Autoren überein (FOX et al. 1985; KURZHALS et al. 1985; WEVER u. EMANUELSON 1989; SCHRÖDER 2003). Abgesehen von den Wochen W2, W8 und W14 waren die Lymphozyten die dominierende Zellart, wie auch in den Veröffentlichungen von DOSOGNE et al. (2003) und SCHRÖDER (2003) beschrieben. Das kurzfristige Überwiegen der PMN im Zelldifferentialbild (Wochen W2, W8 und W14) zeigt, dass in gesunden Vierteln trotz hohen Infektionsdrucks, z. B. im Stall, bakterielle Erreger erfolgreich abgewehrt wurden. Zu beachten ist hierbei die niedrige Stichprobenzahl von n = 8 oder 12.

5.4.1.3 Zellfunktionalität in Blut und Milch

Die Phagozytoseaktivität der Milch-PMN wies in den opsonisierten Proben (60 – 70 % phagozytierende PMN, log MFI: ca. 1,3) höhere Werte auf als in den nicht opsonisierten Proben (ca. 50 %, log MFI: ca. 0,9). Korrespondierend zum Anteil PMN im Differentialzellbild war die Phagozytoseaktivität in Woche W2 höher als in den üb-

rigen Wochen, ein weiterer Hinweis auf eine Auseinandersetzung mit Krankheitserregern. Ab Woche W9 war die Aktivität der Zellen in den Milchproben höher. Die zugrunde liegende Immunsuppression in der Frühlaktation wurde auch in anderen Untersuchungen festgestellt (BURVENICH et al. 1994; SHUSTER et al. 1996; MEHRZAD 2002).

Wie schon in der Literatur beschrieben (DULIN et al. 1988; MEHRZAD et al. 2002), war die CL-Aktivität der Blut-PMN deutlich höher als die der Milch-PMN. Der Peak in Woche W2 stimmte mit den Beobachtungen der Zelldifferenzierung und der Phagozytoseaktivität überein und weist auf ein kurzfristiges Abwehrgeschehen hin. Da die Werte ab Woche W8 in beiden Medien geringfügig höher lagen, konnte auch anhand der CL-Aktivität die Immunsuppression post partum nachvollzogen werden. Allerdings waren die Unterschiede in der CL-Aktivität aus Blut und Milch zwischen Früh- und Mittellaktation nicht so ausgeprägt wie von MEHRZAD (2002) beschrieben. Besonders hochleistende Kühen weisen metabolische Störungen wie Ketose oder Infektionskrankheiten in den ersten zwei Wochen post partum gehäuft auf. Diese stehen in Zusammenhang mit den metabolischen und hormonellen Veränderungen in diesem Zeitraum, aber auch mit einer niedrigen Aktivität zirkulierender PMN (KLUCIŃSKI et al. 1988; NAGAHATA et al. 1988; KEHRLI et al. 1989; HOEBEN et al. 1997). Nach HOEBEN et al. (2000a) ist die Zellaktivität erst sechs Wochen post partum wieder vollständig regeneriert.

5.4.2 Tiere mit unspezifischer Mastitis oder Mastitis

5.4.2.1 Zellzahl im VAG

Die Viertel, die in den Wochen der Erkrankung (Wochen 1 bis 4) Zellzahlen über 100.000 Zellen / ml Milch hatten, konnten nach der allgemein anerkannten Definition (HAMANN u. FEHLINGS 2002) als mastitiskrank eingestuft werden. Eines der drei Tiere hatte in zwei Eutervierteln eine unspezifische Mastitis, die übrigen Kühe zeigten auf je einem Viertel Mastitis.

5.4.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Bereits in Woche 0 lag der Prozentsatz PMN in der Milchzellsuspension der kranken Euterviertel höher als der der gesunden Viertel derselben Tiere. In den Wochen 1 bis 4 (Infektionsphase) lagen die PMN-Anteile der kranken zwischen 53 (Woche 1) und 68 % (Woche 4). Hohe PMN-Anteile sind ein charakteristisches Merkmal infizierter Euterviertel (z. B. PAAPE et al. 1979; CONCHA 1986). Auch die Anteile PMN der gesunden Viertel befanden sich in der Infektionsphase (43 – 58 %) oberhalb der in Abschnitt 5.4.1.2 für gesunde Tiere ermittelten Grenze von 40 %. Dies deutet die Abhängigkeit der Viertel eines Tieres voneinander an, deren Ursache in der Aktivierung des Immunsystems zu finden sein dürfte.

Eine positive Korrelation zwischen dem PMN-Anteil und der Zellzahl in Milch wurde bereits belegt (PAAPE et al. 1979; KURZHALS et al. 1985; ÖSTENSSON et al. 1988; SCHRÖDER 2003). SCHRÖDER (2003) beschrieb mit Hilfe des Zelldifferentialbildes erstmals einen Einfluss kranker Euterviertel auf die nicht betroffenen gesunden Viertel desselben Tieres. Sie ermittelte mit 45 % PMN für gesunde und 61 % PMN für kranke Euterviertel in der Milchzellsuspension Werte, in die sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung einfügten.

In Woche 5 waren die PMN-Anteile niedriger, blieben jedoch in den gesunden wie in den kranken Vierteln über dem Niveau der Woche 0. Aus anderen Veröffentlichungen ist bekannt, dass der Prozentsatz PMN nach einer Infektion erhöht bleibt (CONCHA 1986; BURVENICH et al. 1995).

5.4.2.3 Zellfunktionalität in Blut und Milch

In Woche 0 (vor Beginn der Mastitis) lagen Prozentsatz aktiver Zellen und MFI der kranken Viertel höher als die der gesunden Viertel. Die hohe Aktivität dieser Zellen führte offensichtlich nicht zu einem verbesserten Infektionsschutz des Euterviertels, sondern ist vielmehr Ausdruck eines schon vorhandenen entzündlichen Geschehens.

In den Wochen 1 bis 5 dagegen hatten die Milchzellsuspensionen aus gesunden Vierteln, ähnlich wie in Versuch 1 (s. Abschnitt 5.3.2.3), stets höhere Anteile phago-

zytierender Zellen als diejenigen aus kranken Vierteln. Die MFI, die für die Zahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle steht, war dennoch in den kranken Vierteln durchgehend höher. Da Milch aus erkrankten Euterviertelnmehr phagozytosestimulierende Mediatoren enthält als Milch aus einem gesunden Viertel (JAIN u. LASMANIS 1978; GUIDRY et al. 1980; PAAPE et al. 1981a), ist davon auszugehen, dass die PMN der kranken Viertel schon im Euter stärker stimuliert waren als die der gesunden Viertel, was eine höhere MFI zur Folge hatte. Es ist auch denkbar, dass in vielen Zellen der kranken Viertel aufgrund der starken Stimulation über einen längeren Zeitraum der größte Teil ihrer Phagozytosekapazität oder ihrer Glykogenreserven bereits vor der Messung erschöpft war, und sie deshalb keine Bakterien mehr aufnahmen. Da über die genauen Vorgänge der Aktivierung von Milchzellen bisher nur wenig bekannt ist, liegen diesem Modell keine wissenschaftlichen Erklärungen zugrunde.

Auch in Woche 5 (nach Abklingen der Mastitis) kehrten die Werte der Phagozytoseaktivität nicht auf das Niveau von Woche 0 zurück: Die MFI blieb für alle Viertel leicht erhöht, der Anteil aktiver PMN war in den kranken Vierteln zwar höher als während der Infektionsphase (Wochen 1 bis 4), aber niedriger als in Woche 0. Korrespondierend mit dem PMN-Anteil blieb der Immunstatus nach Abklingen der Entzündung erhöht.

Besonders die nicht betroffenen Viertel hatten während der Krankheitsphase höhere Prozentsätze aktiver Zellen (Proben n: 55 – 65 %, Proben o: ca. 75 %) als die Viertel der gesunden Tiere (Proben n: ca. 50 %, Proben o: 60 – 70 %, s. Abschnitt 5.4.1.3).

Die CL-Aktivität / 1 Mio. PMN aus Blut war stets größer als die aus Milch, wobei die kranken Viertel wiederum höhere Werte aufwiesen als die gesunden. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein (DULIN et al. 1988; MEHRZAD 2002). Die betroffenen Viertel erzeugten in der Infektionsphase CL-Aktivitäten über 4.000 Einheiten / 1 Mio. PMN. Im Gegensatz zur Zelldifferenzierung und zur Phagozytosebestimmung fiel die CL-Aktivität in Woche 5 auf ihre Ausgangswerte zurück.

Die CL-Aktivität / ml Milch der kranken Viertel lag in jeder Woche etwa um das Zehnfache höher als die der gesunden Viertel. Dem Peak in Woche 4 folgte in gesunden

wie in kranken Vierteln ein drastisches Absinken der Werte in Woche 5. Diese Ergebnisse deuten eine Abhängigkeit gesunder und kranker Viertel voneinander an. Genauere Untersuchungen könnten die Festlegung eines Grenzwertes zwischen gesunden und kranken Eutervierteln ermöglichen.

5.4.3 Zusammenfassende Beurteilung

Mit diesem Versuch wurden die Zellzahl und die Parameter des Zelldifferentialbildes sowie der Zellfunktionalität von gesunden und erkrankten Tieren in den ersten drei Laktationsmonaten dokumentiert. Die Werte erkrankter Tiere wurden dabei mit denen der gesunden verglichen. Es wurde jedoch nicht der Anspruch erhoben, anhand der Daten gesunder und kranker Tiere Referenzwerte für die Parameter der Zelldifferenzierung, der Phagozytose- oder der CL-Aktivität zu bilden.

Neben einer konstanten Zellzahl und einem von Lymphozyten dominierten Zelldifferentialbild in Milch ließen sich in der Gruppe der gesunden Tiere steigende Tendenzen in der Phagozytose- und der CL-Aktivität beschreiben. Diese liegen in einer Immunsuppression zu Beginn der Laktation begründet, die auch von anderen Autoren beobachtet wurde (KEHRLI et al. 1989; HOEBEN et al. 2000a; VANGROENWEGHE et al. 2001; MEHRZAD 2002) und zur höheren Empfänglichkeit für Mastitiden beiträgt (z. B. EBERHART et al. 1979).

Die drei an Mastitis erkrankten Tiere wiesen nur in den betroffenen Eutervierteln erhöhte Zellzahlen auf. Die Veränderungen der Zelldifferentialbilder und der funktionellen Eigenschaften der PMN erstreckten sich jedoch auch auf die nicht betroffenen Viertel. Der Anteil PMN im Zelldifferentialbild war sowohl in den kranken als auch in den gesunden Vierteln kranker Tiere höher als in den gesunden Tieren, gleiches galt für die MFI der Phagozytosemessung. Die CL-Aktivität war gegenüber den nicht erkrankten Tieren lediglich in den kranken Vierteln deutlich erhöht. Alle untersuchten Parameter ließen bereits in Woche 0 Unterschiede zwischen gesunden und kranken Vierteln erkennen. Der Anteil PMN und die Phagozytoseaktivität blieben auch nach Abklingen der Mastitis in Woche 5 im Vergleich zu Woche 0 verändert, bestehen blieb auch der Unterschied zwischen den gesunden und den kranken Vierteln.

5.5 Versuch 3: Beurteilung der Eutergesundheit anhand von Kriterien der Zellfunktionalität auf Tierebene

5.5.1 Mehrfach untersuchte Tiere

Da die Werte der selektierten Parameter der Eutergesundheit für jedes Euterviertel zwischen den drei Tagen nicht variierten, konnten die Parameter der Zelldifferenzierung und der Zellfunktionalität unter der Annahme eines gleichbleibenden Eutergesundheitszustandes von Tag zu Tag verglichen werden. Die durchgeführten Varianzanalysen zeigten außer für den Anteil Makrophagen im Zelldifferentialbild Milch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tagen. Die Anteile PMN und Lymphozyten im Differentialzellbild blieben konstant, sodass die Varianz im Prozentsatz Makrophagen vernachlässigt werden konnte. Daher ließ sich eine gute Wiederholbarkeit der aus der Zelldifferenzierung und der Zellfunktionalität erfassten Parameter belegen.

MEHRZAD (2002) ermittelte für die CL-Aktivitätsbestimmung Variationskoeffizienten zwischen 2,6 und 3,5 % aus Blutzellen sowie von 5,2 bis 11,5 % aus Milchzellsuspensionen, sodass auch in dieser Untersuchung eine gute Reproduzierbarkeit angenommen werden konnte.

5.5.2 Gruppen auf Basis der Zellzahl

5.5.2.1 Blutproben

5.5.2.1.1 Vollblutuntersuchungen

PMN und Lymphozyten stellen in der Regel gemeinsam über 90 % der Leukozyten im Blut (BICKHARDT 1992). Ihre Anteile im Zelldifferentialbild korrelierten daher stark (k = -0,83).

Die Leukozytenzahl und das Zelldifferentialbild aus Blut bewegten sich in allen drei Gruppen innerhalb der jeweiligen physiologischen Bereiche (KRAFT u. DÜRR 1997), daher konnten alle Tiere als allgemeingesund eingeordnet werden.

5.5.2.1.2 Zellfunktionalität in Blut

Log Max und die CL-Einheiten / 1 Mio. PMN aus Blut korrelierten miteinander (k = 0,79), sodass von einem ähnlichen Kurvenverlauf in allen Proben ausgegangen werden konnte (s. Abschnitt 5.3.1.2).

Die CL-Aktivität im Blut wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen auf und bestätigte daher die Annahme, dass es sich in allen Gruppen um allgemeingesunde Tiere handelte. Die Gruppe T2 hatte jedoch mit 8.431 Einheiten / 1 Mio. PMN die niedrigste CL-Aktivität.

5.5.2.2 Milchproben

5.5.2.2.1 Eutergesundheit

Der Korrelationskoeffizient zwischen der elektrischen Leitfähigkeit in Milch und dem SCC im VAG von 0,34 entsprach etwa der von GRABOWSKI (2000) ermittelten Korrelation von k = 0,30. Die Korrelationen zwischen NAGase VAG und VGH sowie dem Zellgehalt in Milch von k = 0,50 und 0,53 stimmten ebenfalls mit dem von GRABOWSKI (2000) angegebenen Korrelationskoeffizient von 0,42 überein.

Die Gruppen wurden wie beschrieben auf Tierebene gebildet (s. Abbildung 20). Anhand dieser Parameter konnten die Tiere der Gruppe T1 als eutergesund betrachtet werden (s. Tabelle 81). In den Gruppen T2 und T3 war lediglich die Zellzahl der Gruppe T3 mit ca. 234.000 Zellen / ml Milch (log 5,37) erhöht (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Dies beruht auf der Struktur dieser Gruppen, die sich aus Vierteln mit hohen Zellzahlen und Vierteln mit niedrigen Zellzahlen gleichermaßen zusammensetzten. Gemäß ihrer Definition waren jedoch in den Gruppen T2 und T3 die Tiere vertreten, die in mindestens einem Euterviertel eine Zellzahl von 100.000 – 400.000

Zellen / ml Milch (T2) bzw. über 400.000 Zellen / ml Milch (T3) enthielten. Die Tiere der Gruppen T2 und T3 wurden daher als euterkrank bezeichnet.

Tabelle 81: Beurteilung der Eutergesundheit der Tiere in den Gruppen T1, T2 und T3 anhand der Parameter SCC, elektrische Leitfähigkeit sowie NAGase

Parameter	Referenzbereich*	Gruppe T1	Gruppe T2	Gruppe T3
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 23.400 log 4,37	ca. 76.000 log 4,88	ca. 234.000 log 5,37
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,75	5,89	6,02
log NAGase in nmol x min^{-1} x ml^{-1}	0,22 – 0,50	0,22 (VAG) 0,18 (VGH)	0,37 (VAG) 0,36 (VGH)	0,48 (VAG) 0,41 (VGH)
Beurteilung		eutergesund	euterkrank**	euterkrank**

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002), für NAGase nach GRABOWSKI (2000)

**: Begründung für diese Beurteilung s. Text

5.5.2.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Die Zellzahl in Milch korrelierte mit dem Anteil PMN in der Milchzellsuspension (k = 0,63). Auf den Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern wurde bereits mehrfach hingewiesen (z. B. PAAPE et al. 1981a; KURZHALS et al. 1985; SCHRÖDER 2003; s. auch Abschnitt 5.3.2.2).

Die Verteilung der Zellen in Gruppe T1 von 28,9 % PMN, 22,3 % Lymphozyten und 45,5 % Makrophagen entsprach den Angaben einiger anderer Autoren bezüglich der Zelldifferenzierung gesunder Euterviertel (FOX et al. 1985; WEVER u. EMANUELSON 1989).

Die PMN-Anteile stiegen in den Gruppen T2 und T3 auf 53,2 bzw. 72,3 % an und bildeten die größte Zellfraktion. In den Literaturangaben liegen die PMN-Anteile in Milch gesunder Viertel stets unter 40 %, wobei entweder Makrophagen (z. B. WEVER u. EMANUELSON 1989; ÖSTENSSON 1993) oder Lymphozyten (DOSOGNE

et al. 2003; SCHRÖDER 2003) die dominierende Zellart darstellen. Die vorliegenden Zelldifferentialbilder der Gruppen T2 und T3 bestätigten damit das anhand des Zellzahlbefundes ermittelte Entzündungsgeschehen. Besondere Aufmerksamkeit verdient diese Beobachtung im Hinblick auf die bereits beschriebene Struktur der Gruppen, die Viertel mit unterschiedlichen Zellzahlen enthielten. Dies gilt als Hinweis auf die Abhängigkeit der gesunden Viertel kranker Tiere von den erkrankten Vierteln und ließ den hochsignifikanten Unterschied ($p < 0{,}001$) zwischen den Gruppen T2 und T3 besonders auffällig erscheinen.

5.5.2.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Auch die Parameter der CL-Aktivität M wiesen Korrelationen zur Zellzahl auf, wobei vor allem die CL-Aktivität / ml Milch ($k = 0{,}89$) stark von der Zellzahl abhängig war. Die Gründe dafür wurden bereits in Abschnitt 5.3.2.3 erläutert. Ebenso zeigten die Parameter der CL-Aktivität aus Milch untereinander und zum Anteil PMN erwartungsgemäß überwiegend deutliche Korrelationen.

Während die CL-Aktivität / 1 Mio. PMN in den Gruppen T1 und T2 etwa gleiche Werte hatte und lediglich in Gruppe T3 deutlich höher lag, stieg die CL-Aktivität / ml Milch kontinuierlich an. Die Angaben aus der Literatur bestätigen einen Zusammenhang zwischen der Zellzahl in Milch und der CL-Aktivität (LILIUS und PESONEN 1990), der für den Parameter CL-Aktivität / ml Milch trotz der Selektion auf Tierebene nachvollzogen werden konnte. Für die Gruppe T3 deutete sich an, dass die CL-Aktivität der Tiere sowohl in Blut als auch in Milch insgesamt auf einem höheren Niveau lag als die der anderen Gruppen, was auf eine Aktivierung des gesamten Immunsystems schließen lässt. Die Ergebnisse der Zelldifferenzierung und der Zellzahlbestimmung aus Milch fügten sich in dieses Bild ein. Für die in Gruppe T2 durchgehend niedrigeren funktionellen Zelleigenschaften von Blut und Milch finden sich mehrere denkbare Gründe. Entweder war das Abwehrpotential dieser Tiere aufgrund individueller Unterschiede geringer oder es lagen chronische Infektionen vor, gegen die vor allem lymphozytäre Abwehrsysteme und nicht PMN aktiviert werden (KRAFT u. DÜRR 1997).

5.5.2.3 Folgerungen

Anhand der für die Gruppenbildung vorgegebenen Zellzahlen (s. Abschnitte 3.9.5.2 und 4.5.2) konnten die Tiere der Gruppe T1 als eutergesund, die der Gruppen T2 und T3 als euterkrank eingestuft werden. Die Parameter WBC und PMN-Anteil aus Blut sowie elektrische Leitfähigkeit und NAGase aus Milch wiesen in allen drei Gruppen Werte innerhalb ihrer Referenzbereiche auf. Die Ergebnisse der Zelldifferenzierung und der CL-Aktivität aus Milch zeigten jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Trotz der Selektion auf Tierebene konnte anhand der letztgenannten Parameter in den Gruppen T2 und T3 auf ein Entzündungsgeschehen geschlossen werden. Allerdings wurde auch deutlich, dass eine Aufteilung dieser Gruppen in Viertel mit hoher und solche mit niedriger Zellzahl zur genauen Beschreibung der Eutergesundheit nötig ist.

5.5.3 Euterkranke Tiere

5.5.3.1 Blutproben

Wie schon in Abschnitt 5.5.2.1 festgestellt, lag die CL-Aktivität aus Blut der Gruppe T2 (hier: T2/$_{100-400}$) unter der von Gruppe T3 (hier: T3/$_{100-400}$ und T3/$_{>400}$). Deshalb ließ sich eine stärkere Abwehraktivität in Gruppe T3 vermuten.

5.5.3.2 Milchproben

5.5.3.2.1 Eutergesundheit

Wie anhand ihrer Selektion auf Basis der Zellzahl (s. Abschnitt 4.5.3.2) zu erwarten, überschritten die beiden Gruppen T1/$_{<25}$ und T2&3/$_{<25}$ für die Parameter elektrische Leitfähigkeit, SCC im VAG und NAGase die jeweiligen Grenzwerte nicht und wiesen nur eine signifikant höhere NAGase-Aktivität im VGH der Gruppe T2&3/$_{<25}$ auf (s. Tabelle 82, $p < 0{,}01$). Für den Parameter NAGase wurde ein derartiger Anstieg schon von SCHÜTTEL (1999) beschrieben. Die Viertel beider Gruppen konnten daher als eutergesund bezeichnet werden.

Gemäß ihrer Definition (s. Abschnitt 4.5.3.1 & Abbildung 20) befanden sich die Zellzahlen im VAG der Gruppen T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400 im entzündlichen Bereich über 100.000 Zellen / ml Milch (HAMANN u. FEHLINGS 2002, s. Tabelle 82). Der physiologische Bereich für die NAGase-Aktivität wurde nur in der Gruppe T3/>400 (log 0,62 in VAG und log 0,55 in VGH) überschritten, bezüglich der elektrischen Leitfähigkeit erreichten die Gruppen T3/100–400 und T3/>400 mit 6,2 mS / cm (log 0,79) den Grenzwert. Anhand dieser Parameter konnte demnach bereits ein Unterschied im Grad der Entzündung zwischen den Gruppen festgestellt werden, obwohl die Zellzahlen aller Viertel im Bereich krankhafter Veränderungen lagen.

Tabelle 82: Beurteilung der Eutergesundheit der Viertel in den Gruppen T1/<25, T2&3/<25, T2&3/>100, T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400 anhand der Parameter SCC, elektrische Leitfähigkeit sowie NAGase

Parameter	Referenzbereich*	T1/<25	T2&3/<25	T2&3/>100
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 13.000 log 4,12	ca. 14.000 log 4,15	ca. 330.000 log 5,52
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,62	5,50	6,17
log NAGase in nmol x min^{-1} x ml^{-1}	0,22 – 0,50	0,13 (VAG) 0,08 (VGH)	0,20 (VAG) 0,22 (VGH)	0,51 (VAG) 0,49 (VGH)
Beurteilung		gesund	gesund	krank
Parameter	**Referenzbereich***	**T2/100–400**	**T3/100–400**	**T3/>400**
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 195.000 log 5,29	ca. 195.000 log 5,29	ca. 800.000 log 5,91
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	6,03	6,17	6,17
log NAGase in nmol x min^{-1} x ml^{-1}	0,22 – 0,50	0,47 (VAG) 0,49 (VGH)	0,42 (VAG) 0,40 (VGH)	0,62 (VAG) 0,55 (VGH)
Beurteilung		krank	krank	krank

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002), für NAGase nach GRABOWSKI (2000)

5.5.3.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Der Anteil PMN in Milch wies in Gruppe T2&3/<25 (38,4 %) signifikant höhere Werte (p < 0,001) auf als in Gruppe T1/<25 (22,2 %). Dieses als Reaktion der gesunden Euterviertel auf die Erkrankung benachbarter Viertel zu betrachtende Phänomen wurde bereits von SCHRÖDER (2003) beschrieben. Die Erkrankung einzelner Euterviertel sorgt für eine Ausschüttung von PMN aus dem marginalen Pool ins Blut, von dem aus diese dann vermehrt ins Euter gelangen (BURVENICH et al. 1994). Korrespondierend zu den Angaben von SCHRÖDER (2003) war der Unterschied im Anteil PMN in der Milchzellsuspension zwischen den gesunden (T2&3/<25) und den kranken Eutervierteln erkrankter Tiere (T2&3/>100) hochsignifikant (p < 0,001). Systemische Einflüsse spielten hier jedoch keine Rolle, die lokale Immunitätslage schien in den erkrankten Vierteln für einen vermehrten Zustrom von PMN verantwortlich zu sein.

In den Gruppen T2/100–400, T3/100–400 und T3/>400 stieg der Anteil PMN in der Milchzellsuspension von Gruppe zu Gruppe an. In der einzigen bisher zu diesem Thema durchgeführten Untersuchung (SCHRÖDER 2003) konnte ebenfalls ein Anstieg des Prozentsatzes PMN von Vierteln mit 100.000 – 400.000 Zellen / ml Milch zu Vierteln mit über 400.000 Zellen / ml Milch festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit war der Anteil PMN in der Milchzellsuspension in Gruppe T3/100–400 (72,5 %) höher als in Gruppe T2/100–400 (62,1 %), obwohl beide Gruppen gleiche Zellzahlen hatten. Der Unterschied zwischen den Gruppen T3/100–400 und T3/>400 war nicht signifikant (p ≥ 0,05), was auf eine gegenseitige Beeinflussung der Viertel eines Tieres schließen lässt.

5.5.3.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Im Widerspruch zum Zelldifferentialbild war die CL-Aktivität M in Gruppe T2&3/<25 (2.595 Einheiten / 1 Mio. PMN) signifikant niedriger (p < 0,05) als in Gruppe T1/<25 (4.780 Einheiten / 1 Mio. PMN). Welche Aktivierungsvorgänge oder stimulierende Mediatoren dabei eine Rolle spielen, blieb unklar. Die CL-Aktivität / ml Milch dagegen war in dieser Gruppe nur geringfügig niedriger. Wenn dieser Parameter den Schutz

des Euters vor Infektionen ausdrückt, so stand eindringenden Krankheitserregern in beiden Gruppen das gleiche Abwehrpotential gegenüber.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen T2&3/<25 und T2&3/>100 in der CL-Aktivität aus Milch waren im Hinblick auf die Tatsache, dass die Milchproben beider Gruppen denselben Tieren entstammten, besonders auffällig. Dies ist dahingehend einzuordnen, dass in Milch aus erkrankten Eutervierteln wesentlich mehr Mediatoren vorhanden sind als in Milch aus gesunden Vierteln (JAIN u. LASMANIS 1978; GUIDRY et al. 1980; PAAPE et al. 1981a; RIOLLET et al. 2000). Die PMN aus Gruppe T2&3/>100 erfuhren dadurch offensichtlich eine dramatisch stärkere Stimulation als die aus Gruppe T2&3/<25. Die Diskrepanz zwischen dem vermehrten PMN-Einstrom in die nicht betroffenen Euterviertel und der ausbleibenden Stimulation dieser Zellen gehört zu den Phänomenen, die in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden müssen.

Die CL-Aktivität aus Milch in Gruppe T2/100–400 (6.865 Einheiten / 1 Mio. PMN) lag signifikant niedriger als in den Gruppen T3/100–400 und T3/>400 ($p < 0,01$). Sowohl die höhere Zellzahl als auch der größere PMN-Anteil in Gruppe T3 waren Hinweise auf eine stärkere Aktivierung des Immunsystems der Tiere dieser Gruppe. Untersuchungen dieser Art zur Zellfunktionalität sind bisher nicht veröffentlicht worden.

5.5.3.3 Folgerungen

Die Viertel der Gruppen T1/<25 und T2&3/<25 waren eutergesund (s. Abschnitt 5.5.3.2). Dennoch war der Anteil PMN in Milch der Gruppe T2&3/<25 signifikant höher ($p < 0,001$) und die CL-Aktivität dieser Gruppe signifikant niedriger ($p < 0,05$) als in Gruppe T1/<25. Der hohe Prozentsatz PMN ist auf die Abhängigkeit der gesunden von den kranken Eutervierteln eines Tieres zurückzuführen, die niedrige CL-Aktivität wurde bisher weder beschrieben noch begründet. Im Rahmen zukünftiger Forschungsvorhaben könnte der Einfluss der in Milch enthaltenen Mediatoren auf funktionelle Zelleigenschaften untersucht werden.

Als euterkrank eingestuft wurden die Viertel der Gruppen T2/100–400, T3/100–400, T3/>400 sowie T2&3/>100. Der Vergleich der erkrankten Euterviertel zwischen den

Gruppen T2 und T3 ließ Unterschiede in den Parametern der Zelldifferenzierung und der CL-Aktivität erkennen. Hier war, unabhängig vom Zellzahlbefund, die Zellaktivität in Blut und Milch der Tiere aus Gruppe T3 durchgehend höher als die aus Gruppe T2. Der Unterschied in der CL-Aktivität zwischen den Gruppen T2 und T3 im Blut zeigte, dass das gesamte Immunsystem des Tieres aktiviert wurde, was sich wiederum in der höheren CL-Aktivität in den Milch-PMN der Gruppe T3/100–400 verglichen mit Gruppe T2/100–400 äußerte. Dies ist als Ausdruck dafür zu bewerten, dass über einen systemischen Einfluss die Zellaktivitäten aller Euterviertel voneinander abhängig sind. Weiterhin schien sich abzuzeichnen, dass erkrankte Euterviertel CL-Aktivitäten über 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN aufwiesen.

Die großen Unterschiede zwischen gesunden und kranken Vierteln derselben Tiere (Gruppe T2&3/<25 bzw. T2&3/>100) hinsichtlich des Zelldifferentialbildes und der Zellfunktionalität in Milch lagen vermutlich in einem stark unterschiedlichen Vorkommen von Mediatoren wie Immunglobulinen und der Komplementkomponente C3b in der Milch begründet (CRAVEN u. WILLIAMS 1985; MILLER et al. 1988), die die PMN zunächst anlocken und dann aktivieren. Die Zellen der Gruppe T2&3/>100 erfuhren dadurch bereits im Euter eine Vorstimulation. Die niedrigen Werte der gesunden Viertel dieser Tiere ließen sich dadurch jedoch nicht endgültig erklären, da das Wissen über die Immunabwehr des Euters noch zu gering ist.

5.5.4 Bakteriologischer Status und Zellfunktionalität

5.5.4.1 Blutproben

5.5.4.1.1 Vollblutuntersuchungen

Der Grenzwert von 10 Mio. Leukozyten / ml Blut (WBC) wurde in keiner der Gruppen, der des Anteils PMN in Blut von 50 % nur in Gruppe Kat3 (54,5 %) überschritten (KRAFT u. DÜRR 1997). Die Tiere der Gruppen Kat1, Kat2 und Kat4 konnten daher als allgemeingesund bezeichnet werden, während die Allgemeingesundheit in Gruppe Kat3 in Frage gestellt werden musste.

5.5.4.1.2 Zellfunktionalität in Blut

Die CL-Aktivität B lag in Gruppe Kat3 signifikant niedriger als in allen anderen Gruppen ($p < 0,05$). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Blut vermehrt stabkernige PMN zirkulierten, die ein geringeres Potential zur Bildung von Sauerstoffradikalen besitzen (GLASSER u. FIEDERLEIN 1987).

5.5.4.2 Milchproben

5.5.4.2.1 Eutergesundheit

Unter Berücksichtigung der bakteriologischen Untersuchung waren die Tiere der Gruppe Kat1 nach der allgemein anerkannten Kategorisierung (HAMANN u. FEHLINGS 2002) eutergesund und die der Gruppe Kat2 latent infiziert (s. Abschnitt 4.5.4, Abbildung 21).

Den Maßstäben für die Gruppenzuordnung entsprechend hatten die Tiere der Gruppe Kat3 eine unspezifische Mastitis, die Tiere der Gruppe Kat4 eine Mastitis (s. Tabelle 83). Die Abweichung der mittleren Zellzahlen von den genannten Angaben erklärt sich dadurch, dass meist nur ein Viertel eines Tieres erkrankt war, die Gruppenbildung aber auf Tierebene vorgenommen worden war.

Tabelle 83: Beurteilung der Eutergesundheit der Tiere in den Gruppen Kat1 bis Kat4 anhand der Parameter SCC, elektrische Leitfähigkeit, NAGase sowie Bakteriologie

Parameter	Referenz-bereich*	Kat1	Kat2	Kat3	Kat4
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 23.500 log 4,37	ca. 24.000 log 4,38	ca. 71.000 log 4,85	ca. 180.000 log 5,26
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,62	5,89	5,89	6,03
log NAGase in nmol x min^{-1} x ml^{-1}	0,22 – 0,50	0,22 (VAG) 0,17 (VGH)	0,26 (VAG) 0,22 (VGH)	0,43 (VAG) 0,53 (VGH)	0,43 (VAG) 0,37 (VGH)
Bakteriologie		negativ	positiv	negativ	positiv
Beurteilung		normale Sekretion	latent infiziert**	unspez. Mastitis**	Mastitis

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002), für NAGase nach GRABOWSKI (2000)

**: Begründung für diese Beurteilung s. Text

5.5.4.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Die Gruppen Kat1 und Kat2 wiesen bezüglich des Anteils PMN in Milch mit 28,7 bzw. 32,6 % Werte auf, deren Zuordnung zu gesunden Eutervierteln in der Literatur Bestätigung findet (z. B. KURZHALS et al. 1985; FOX et al. 1985; DOSOGNE et al. 2003; SCHRÖDER 2003).

Da die PMN mit 54,9 bzw. 66,2 % die dominierende Zellart in den Milchzellsuspensionen der Gruppen Kat3 und Kat4 waren, wurden die Tiere anhand dieses Parameters ebenfalls als nicht gesund eingestuft. Auch hier war der Anteil PMN offensichtlich sowohl in den erkrankten als auch in den nicht betroffenen Eutervierteln höher als in den Tieren der Gruppen Kat1 und Kat2, wobei für die Verteilung der Zellarten die Höhe des SCC, aber nicht die Anwesenheit von Bakterien entscheidend war.

5.5.4.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Anders als in den übrigen Parametern unterschieden sich die Vitalität sowie die CL-Aktivität zwischen den Gruppen Kat3 und Kat4 signifikant voneinander ($p < 0,05$). Die CL-Aktivität der Gruppe Kat3 lag mit 5.016 Einheiten / 1 Mio. PMN etwa so hoch wie die der Gruppen Kat1 und Kat2. So ließ sich für die funktionellen Zelleigenschaften lediglich in Gruppe Kat4 ein Einfluss erkrankter Euterviertel auf die gesunden Viertel sicher feststellen.

Sofern die CL-Aktivität / ml Milch als Ausdruck eines Infektionsschutzes betrachtet werden kann, war die Abwehr in den Tieren der Gruppe Kat3 mit log 1,95 signifikant höher ($p < 0,001$) als in den Gruppen Kat1 (log 1,03) und Kat2 (log 1,25).

5.5.4.3 Differenzierte Auswertung gesunder und kranker Viertel der Tiere mit Mastitis (Gruppen Kat4/<100 und Kat4/>100)

5.5.4.3.1 Blutproben

Wie schon in Abschnitt 5.5.4.1.1 festgestellt, lag die Leukozytenzahl der Gruppe Kat4 signifikant höher als in Gruppe Kat1, jedoch innerhalb des Referenzbereiches. Die Tiere beider Gruppen waren allgemeingesund.

5.5.4.3.2 Milchproben

5.5.4.3.2.1 Eutergesundheit

Obwohl sich die Zellzahlen in Milch der Gruppen Kat1 (gesunde Tiere) und Kat4/<100 (gesunde Viertel kranker Tiere) signifikant voneinander unterschieden ($p < 0,01$), stimmten die Werte der Entzündungsparameter elektrische Leitfähigkeit, NAGase VAG und VGH miteinander überein. Die Viertel dieser Gruppen konnten als eutergesund bezeichnet werden (s. Tabelle 83 und 84). Die Viertel der Gruppe Kat4/>100 (kranke Viertel) wurden anhand des zytobakteriologischen Befundes als mastitiskrank eingestuft.

Tabelle 84: Beurteilung der Eutergesundheit der Viertel in den Gruppen Kat4/<100 und Kat4/>100 anhand der Parameter SCC, elektrische Leitfähigkeit, NAGase sowie Bakteriologie			
Parameter	Referenzbereich*	Kat4/<100	Kat4/>100
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 36.000 log 4,56	ca. 370.000 log 5,57
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,62	6,17
log NAGase in nmol x min^{-1} x ml^{-1}	0,22 – 0,50	0,15 (VAG) 0,13 (VGH)	0,49 (VAG) 0,42 (VGH)
Bakteriologie		negativ	positiv
Beurteilung		normale Sekretion	Mastitis**

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002), für NAGase nach GRABOWSKI (2000)

**: Begründung für diese Beurteilung s. Text

5.5.4.3.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

Wie in Abschnitt 5.5.3.2.2 variierte auch das Zelldifferentialbild zwischen den Vierteln gesunder Tiere (Kat1) und den gesunden Vierteln kranker Tiere (Kat4/<100) deutlich. Im Gegensatz zu Gruppe Kat1 (28,7 %) waren die PMN in Gruppe Kat4/<100 (49,2 %) die dominierende Zellart. In Gruppe Kat4/>100 lag der Prozentsatz PMN mit 72,4 % in einem Bereich, der auch an anderer Stelle als Ausdruck einer Entzündungsreaktion bewertet wurde (SCHRÖDER 2003). Die Abhängigkeit der Euterviertel eines Tieres voneinander wurde dadurch unterstrichen.

5.5.4.3.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Analog zum Zelldifferentialbild lag die CL-Aktivität der Gruppe Kat4/<100 höher als die aus Gruppe Kat1, aber unter der der Gruppe Kat4/>100. Die Vitalität der beiden Gruppen aus Kat4 war jedoch identisch. Daraus lässt sich schließen, dass die Tiere der Gruppen Kat1 und Kat4 ein grundsätzlich unterschiedliches Zellaktivitätsniveau besaßen, und dass die PMN im Euterviertel je nach spezifischem Gesundheitszu-

stand eine weitere Aktivierung erfuhren. Konkrete Daten zu dieser Thematik sind aus keiner Veröffentlichung bekannt.

5.5.4.4 Folgerungen

Die Parameter der Zelldifferenzierung und der Zellfunktionalität wurden im Zusammenhang mit der zytobakteriologischen Kategorisierung der Eutergesundheit untersucht (HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Dabei wurde festgestellt, dass sich das Zelldifferentialbild hauptsächlich in Abhängigkeit von der Zellzahl ändert, während bezüglich der CL-Aktivität die Zellzahl sowie der bakteriologische Status eine Rolle zu spielen scheinen.

Der Vergleich gesunder Viertel kranker Tiere (Kat4/<100) mit den Vierteln eutergesunder Tiere (Kat1) zeigte, dass Viertel aus Gruppe Kat4, die anhand der zytobakteriologischen Untersuchung normale Sekretion aufwiesen (HAMANN u. FEHLINGS 2002), sich im Zelldifferentialbild ebenso wie in der CL-Aktivität signifikant von gesunden Tieren unterschieden, und bestätigte damit die Beobachtungen aus Abschnitt 5.5.3, dass sich die Viertel eines Tieres gegenseitig beeinflussen. Auch der Unterschied zwischen den gesunden und den kranken Vierteln erkrankter Tiere konnte wiederholt dargestellt werden. Im Widerspruch zu den hier vorliegenden Daten wurde in Abschnitt 5.5.3.2.2.3 für die gesunden Viertel kranker Tiere eine wesentlich niedrigere CL-Aktivität festgestellt als für die Viertel gesunder Tiere, wobei die Zellzahlen in beiden Gruppen jedoch im Bereich unter 25.000 Zellen / ml Milch lagen. Der in diesem Zellzahlbereich scheinbar bessere Gesundheitszustand als der Bereich bis 100.000 Zellen / ml Milch bietet Anlass, den Grenzwert von 100.000 Zellen / ml Milch zwischen gesund und krank zu überprüfen.

5.5.5 Zusammenfassende Beurteilung

Im Rahmen einer Beurteilung der Eutergesundheit auf Tierebene wurde mit zunehmender Reduktion der Eutergesundheit ein Anstieg des PMN-Anteils und der CL-Aktivität in den Milchzellsuspensionen festgestellt. Die niedrige CL-Aktivität im Blut

der Tiere von Gruppe T2 deutete auf eine schlechtere Abwehrlage dieser Tiere hin, obwohl die Prozentsätze PMN der Gruppen T2 und T3 gleich waren.

Die Auswertung der Daten aus den Gruppen T2 und T3 ließ eine Abhängigkeit der Euterviertel eines Tieres voneinander erkennen. Im Zelldifferentialbild und in der Zellfunktionalität von Milch unterschieden sich die gesunden Viertel kranker Tiere deutlich von den Vierteln gesunder Tiere. Während der höhere PMN-Anteil in Milch in Gruppe T2&3/<25 den Erwartungen entsprach, konnte die Ursache für die niedrige CL-Aktivität in dieser Gruppe nicht abschließend geklärt werden. Vermutlich spielen Entzündungsmediatoren in der Milch dabei eine Rolle.

Der Vergleich der erkrankten Euterviertel aus den Gruppen T2 und T3 zeigte in Gruppe T3 sowohl höhere Anteile PMN im Zelldifferentialbild als auch höhere Zellaktivitäten. Trotz unterschiedlicher Zellzahlen lagen die PMN-Anteile der Milchzellsuspensionen sowie die Zellaktivität in Milch der erkrankten Euterviertel aus Gruppe T3 (T3/100–400 und T3/>400) auf gleichem Niveau, während die Werte in Gruppe T2/100–400 signifikant darunter lagen ($p < 0,01$). Offensichtlich erstreckt sich die Aktivierung der Immunabwehr auf das ganze Tier und nicht nur auf das einzelne Euterviertel. Die Veränderungen der untersuchten Parameter in den gesunden Vierteln euterkranker Tiere (T2&3/<25) sowie in den kranken Eutervierteln (T2&3/>100) im Vergleich zu den Vierteln eutergesunder Tiere (T1) sind in Tabelle 85 zusammenfassend dargestellt.

Die Einteilung der Daten anhand der zytobakteriologischen Untersuchung bestätigte die Ergebnisse aus den ersten beiden Abschnitten und zeigte darüber hinaus, dass die Zelldifferenzierung sowie die Zellfunktionalität stärker von der Zellzahl als vom bakteriologischen Status beeinflusst werden.

Tabelle 85: Veränderungen ausgewählter Parameter in Milch kranker Tiere im Vergleich zu den Vierteln eutergesunder Tiere

Parameter	gesunde Viertel kranker Tiere	kranke Euterviertel
SCC	→	↑
Elektr. Leitfähigkeit	→	↑
NAGase	↑	↑
PMN	↑	↑
Lymphozyten	→	↓
Makrophagen	↓	↓
Vitalität	→	↑
CL-Aktivität / 1 Mio. PMN	↓	↑
CL-Aktivität / ml Milch	→	↑

5.6 Gesamtdatenbank: Beurteilung der Eutergesundheit anhand von Kriterien der Zellfunktionalität auf Viertelebene

5.6.1 Gruppen auf Basis der Zellzahl

5.6.1.1 Eutergesundheit

Die Korrelation zwischen der elektrischen Leitfähigkeit und dem SCC in Milch von k = 0,37 fügte sich in die Angaben von GRABOWSKI (2000) ein (k = 0,30).

Anhand der Zellzahl und der elektrischen Leitfähigkeit (s. Tabelle 86) konnten die Viertel der Gruppen V1 (SCC < 50.000 Zellen / ml VAG, s. Abbildung 22) und V2 (SCC 50.000 – 100.000 Zellen / ml VAG) als eutergesund eingestuft werden (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Nach HAMANN und FEHLINGS (2002) beginnen entzündliche Veränderungen oberhalb einer Zellzahl von 100.000 Zellen / ml Milch, sodass die Viertel aus Gruppe V3 (100.000 – 200.000 Zellen / ml VAG) erkrankt waren.

Tabelle 86: Beurteilung der Eutergesundheit der Viertel in den Gruppen V1 bis V4 anhand der Parameter SCC und elektrische Leitfähigkeit

Parameter	Referenzbereich*	V1	V2	V3	V4
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 15.000 log 4,18	ca. 68.000 log 4,83	148.000 log 5,17	575.000 log 5,76
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,62	5,89	6,03	6,46
Beurteilung		gesund	gesund	krank	krank

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002)

5.6.1.2 Zelldifferentialbild in Milch

Sowohl der Anstieg der Zellzahl in Milch als auch des Anteils PMN in der Milchzellsuspension sind Hinweise auf ein Entzündungsgeschehen im Euter (PAAPE et al.

1981a; KURZHALS et al. 1985; SCHRÖDER 2003). Dies ließ sich anhand der positiven Korrelation zwischen diesen beiden Parametern nachvollziehen (k = 0,69).

Die als gesund eingeordneten Viertel der Gruppe V1 hatten mit 31,6 % PMN, 30,5 % Lymphozyten und 30,9 % Makrophagen ein Zellbild in Milch, das nicht mit den Angaben aus der Literatur übereinstimmte. Bei den gesunden Tieren (Gruppe T1) aus Versuch 3 lag der PMN-Anteil mit 28,9 % nur geringfügig niedriger, die Makrophagen stellten jedoch mit 45,5 % analog zu den Erkenntnissen anderer Autoren den dominierenden Zellanteil dar (FOX et al. 1985; WEVER u. EMANUELSON 1989). Da der Anteil PMN mit den Ergebnissen eigener Untersuchungen (s. Abschnitte 4.3.3.2.2, 4.4.1.2 und 4.5.2.2.2.2) und auch mit neueren Quellen (DOSOGNE et al. 2003; SCHRÖDER 2003) korrespondierte, wurde die Annahme, dass die Viertel dieser Gruppe eutergesund waren, aufrechterhalten.

Bereits in Gruppe V2 befand sich der Prozentsatz PMN mit 49,8 % über dem für gesunde Euterviertel zu erwartenden (z. B. SCHRÖDER 2003), in den Gruppen V3 (67,5 % PMN) und V4 (76,3 % PMN) war zudem ein deutlicher Rückgang der Makrophagenanteile festzustellen. Ein Anteil von bis zu 95 % PMN in Milch, der häufig für akut erkrankte Euterviertel angegeben wird (PAAPE et al. 1979; CONCHA 1986), wurde aus dem Grund nicht erreicht, dass in der vorliegenden Untersuchung überwiegend Tiere mit chronischen Mastitiden beprobt wurden. Chronische Entzündungen zeichnen sich durch einen Rückgang des PMN-Anteils zugunsten von Makrophagen und Lymphozyten aus (CONCHA 1986; KRAFT u. DÜRR 1997). Die genannten Prozentzahlen für PMN der Gruppen V2 bis V4 können deshalb als Zeichen für ein Entzündungsgeschehen im Euter gewertet werden.

5.6.1.3 Zellfunktionalität in Milch

Die Parameter der CL-Aktivität in Milch zeigten sowohl zur Zellzahl als auch zum Anteil PMN Korrelationen, was auf einen Zusammenhang zwischen der CL-Aktivität und der Eutergesundheit schließen ließ (MEHRZAD 2002). Die von LILIUS und PESONEN (1990) beschriebene Abhängigkeit der CL-Aktivität von der Zellzahl in Milch konnte damit bekräftigt werden.

Analog zu Zellzahl und PMN-Anteil stieg die CL-Aktivität in der Milchzellsuspension von Gruppe V1 zu Gruppe V4 an. Während die CL-Aktivität in Gruppe V1 mit 3.607 Einheiten / 1 Mio. PMN noch unter dem Durchschnitt von Gruppe T1 (Versuch 3) lag und als Grundwert für Viertel mit normaler Sekretion betrachtet werden könnte, gaben bereits die Gruppen V2 und V3 mit je über 6.000 Einheiten Anlass zu der Annahme, dass diese PMN durch Entzündungsmediatoren in der Milch aktiviert wurden (JAIN u. LASMANIS 1978; GUIDRY et al. 1980; PAAPE et al. 1981a). Die Gruppe V4 wies mit über 10.000 Einheiten / 1 Mio. PMN Werte auf, die gewöhnlich nur in Blut-PMN nachgewiesen werden (s. z. B. Abschnitt 5.5.2.1) und die ein hohes Aktivitätsniveau der PMN deutlich erkennen ließen.

5.6.1.4 Folgerungen

Zusammenfassend ließen sich die Viertel der Gruppe V1 anhand aller erhobenen Parameter als eutergesund bezeichnen. In Gruppe V2 lag die mittlere Zellzahl unter dem Grenzwert von 100.000 Zellen / ml Milch, der Anteil PMN im Zelldifferentialbild und die CL-Aktivität ließen jedoch das Vorliegen einer Entzündung vermuten. Obwohl in Gruppe V3 Zellzahl und Anteil PMN signifikant höher waren ($p < 0,05$), lag die CL-Aktivität auf gleicher Höhe wie in Gruppe V2. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass entzündliche Veränderungen schon unterhalb von 100.000 Zellen / ml Milch beginnen. Die Immunitätslage verändert sich jedoch kontinuierlich, sodass eine klinische Manifestation einer Mastitis erst in einem höheren Zellzahlbereich zu erwarten ist. Es scheint gerechtfertigt, den Zellzahlbereich von 50.000 bis 200.000 Zellen / ml Milch als Übergangsbereich zu betrachten, in dem entzündliche Veränderungen beginnen. In Gruppe V4 wiederum sprachen die Werte aller erfassten Parameter eindeutig für das Vorliegen einer Mastitis. Eine CL-Aktivität in Milch über 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN ist daher möglicherweise ein Hinweis auf das Vorliegen einer Eutererkrankung im betroffenen Viertel.

5.6.2 Gruppen auf Basis der CL-Aktivität M

5.6.2.1 Eutergesundheit

Die Viertel wurden auf der Grundlage einer ansteigenden CL-Aktivität in Milch in die Gruppen CL1, CL2 und CL3 unterteilt (s. Abbildung 22 und Tabelle 87). Trotz der abweichenden Selektionsgrundlage stieg die Zellzahl im VAG von Gruppe CL1 zu Gruppe CL3 kontinuierlich an. Der Grenzwert von 100.000 Zellen / ml Milch (HAMANN u. FEHLINGS 2002) wurde nur in Gruppe CL3 überschritten. Die Gruppe CL2 lag mit fast 80.000 Zellen / ml Milch jedoch in dem als kritisch anzusehenden Bereich von 50.000 bis 200.000 Zellen / ml Milch (s. Abschnitt 5.6.1). Anhand der in Tabelle 87 aufgeführten Parameter ließen sich die Viertel der Gruppen CL1 und CL2 als eutergesund, die der Gruppe CL3 als euterkrank einstufen. Der von LILIUS und PESONEN (1990) dokumentierte Anstieg der CL-Aktivität im Rahmen steigender Zellzahlen konnte hiermit bestätigt werden.

Tabelle 87: Beurteilung der Eutergesundheit der Viertel in den Gruppen CL1 bis CL3 anhand der Parameter SCC und elektrische Leitfähigkeit

Parameter	Referenzbereich*	CL1	CL2	CL3
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 16.000 log 4,2	ca. 80.000 log 4,9	ca. 250.000 log 5,4
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,62	6,17	6,17
Beurteilung		gesund	gesund	krank

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002)

5.6.2.2 Zelldifferentialbild in Milch

In Gruppe CL1 wurde ein Zelldifferentialbild in Milch von 33,1 % PMN, 33,4 % Lymphozyten und 26,6 % Makrophagen ermittelt, welches den Angaben über gesunde Euterviertel nicht vollständig entsprach. In Milchzellsuspensionen aus Vierteln gesunder Tiere überwog in einigen Untersuchungen der Anteil Makrophagen (PAAPE

et al. 1981a; KURZHALS et al. 1985; FOX et al. 1985), während neuere Veröffentlichungen eine Dominanz des Lymphozytenanteils herausstellten (DOSOGNE et al. 2003; SCHRÖDER 2003). Aber das Laktationsstadium und eventuell vorangegangene Infektionen beeinflussen den Anteil dieser Zellarten in Milch. Da in der Gruppe CL1 Viertel von gesunden und von kranken Tieren sowie aus verschiedenen Laktationsstadien vertreten waren, ist ein solches Zelldifferentialbild aus eutergesunden Vierteln vorstellbar. Der Anteil PMN stimmte mit den Ergebnissen aus eigenen Untersuchungen (s. Abschnitte 4.4.1.2 und 4.6.1) und denen anderen Autoren überein (z. B. KURZHALS et al. 1985; FOX et al. 1985; DOSOGNE et al. 2003; SCHRÖDER 2003), sodass im Hinblick darauf die Viertel der Gruppe CL1 als gesund eingestuft wurden.

Der Anteil PMN betrug in Gruppe CL2 46,4 % und in Gruppe CL3 68,0 %. Beide Werte lagen damit oberhalb der eigenen sowie der in der Literatur diskutierten Angaben über Milch gesunder Euterviertel, sodass die Viertel als krank bezeichnet werden konnten (z. B. FOX et al. 1985; WEVER u. EMANUELSON 1989; DOSOGNE et al. 2003). Ein für akute Mastitiden angegebener PMN-Anteil von 90 % (PAAPE et al. 1979; CONCHA 1986) wurde vermutlich deshalb nicht erreicht, da es sich bei den beprobten Tieren vornehmlich um solche mit chronischen Euterkrankheiten handelte.

5.6.2.3 Zellfunktionalität in Milch

Aufgrund der beschriebenen Gruppenselektion wurde die CL-Aktivität in Milch von Gruppe zu Gruppe größer. Die Vitalität dagegen war nur in Gruppe CL1 niedriger als in den anderen Gruppen, ein Parameter, der von MEHRZAD (2002) ausführlich untersucht wurde. Er stellte fest, dass die Vitalität positiv mit der CL-Aktivität korrelierte. Beide Beobachtungen bestätigen, dass es für die Vitalität in Milch einen Grenzwert zwischen gesunden und erkrankten Eutervierteln geben muss.

Die Gruppe CL1 enthielt mit einer Zellzahl unter 50.000 Zellen / ml Milch, einem niedrigem PMN-Anteil in der Milchzellsuspension sowie einer geringen CL-Aktivität (1.104 Einheiten / 1 Mio. PMN) gesunde Euterviertel. Der Bereich von 3.000 bis 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN in Milch (Gruppe CL2) stellte wahrscheinlich den Be-

ginn von Immunreaktionen gegen Erreger dar. In der Gruppe CL3 lagen die Parameter Zellzahl, PMN-Anteil und CL-Aktivität so hoch, dass von dem Vorliegen einer Infektion ausgegangen werden konnte. Wie in Versuch 3 (s. Abschnitt 5.5) wiesen die euterkranken Viertel aus Gruppe CL3 CL-Aktivitäten über 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN auf, sodass dies als Grenzwert betrachtet werden kann.

5.6.2.4 Auswertung der Gruppe CL2 anhand der Zellzahl (Gruppen CL2/$_{T<100}$, CL2/$_{V<100}$ und CL2/$_{V>100}$)

5.6.2.4.1 Eutergesundheit

Die Gruppenbildung basierte auf einer Auswahl von Vierteln mit CL-Aktivitäten zwischen 3.000 und 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN in der Milchzellsuspension, die anhand der Zellzahl in Milch auf Tierebene (CL2/$_{T<100}$) bzw. auf Viertelebene (CL2/$_{V<100}$ und CL2/$_{V>100}$) selektiert wurden (s. Abbildung 22). In den Gruppen CL2/$_{T<100}$ und CL2/$_{V<100}$ konnte von gesunden Eutervierteln ausgegangen werden. Die Viertel der Gruppe CL2/$_{V>100}$ wurden als euterkrank bezeichnet (s. Tabelle 88).

Tabelle 88: Beurteilung der Eutergesundheit der Viertel in den Gruppen CL2/$_{T<100}$, CL2/$_{V<100}$ und CL2/$_{V>100}$ anhand der Parameter SCC und elektrische Leitfähigkeit

Parameter	Referenzbereich*	CL2/$_{T<100}$	CL2/$_{V<100}$	CL2/$_{V>100}$
SCC in Zellen / ml VAG	≤ 100.000 ≤ log 5,00	ca. 28.000 log 4,45	ca. 41.000 log 4,61	ca. 310.000 log 5,49
elektr. Leitfähigkeit in mS / cm	4,8 – 6,2	5,89	5,89	6,76
Beurteilung		gesund	gesund	krank

*: Referenzwerte für SCC und elektr. Leitfähigkeit nach HAMANN u. FEHLINGS (2002)

5.6.2.4.2 Zelldifferentialbild in Milch

Trotz ähnlicher Zellzahlen und geringer Stichprobengrößen wiesen die Gruppen CL2/$_{T<100}$ und CL2/$_{V<100}$ signifikante Unterschiede in der Zelldifferenzierung der

Milchzellsuspensionen auf ($p < 0{,}001$). Das Zellbild in Gruppe CL2/$_{T<100}$ gab mit 24,6 % PMN, 22,8 % Lymphozyten und 38,0 % Makrophagen eine in gesunden Eutervierteln übliche Verteilung der Zellarten wieder (z. B. WEVER u. EMANUELSON 1989; MILLER et al. 1991). Der hohe Anteil PMN in Gruppe CL2/$_{V<100}$ deutete auf ein Entzündungsgeschehen in diesen Vierteln hin, was dem Zellzahlbefund jedoch widersprach. Dies bestätigte die Vermutung, dass gesunde Viertel von benachbarten erkrankten Vierteln hinsichtlich ihres Immunstatus beeinflusst werden. Durch den noch höheren Anteil PMN in Gruppe CL2/$_{V>100}$ (65,5 %) konnten diese Viertel auch anhand der Zelldifferenzierung als krank erkannt werden (s. Abschnitt 5.6.2.2).

5.6.2.4.3 Zellfunktionalität in Milch

Die CL-Aktivität / 1 Mio. PMN in Milch war in allen drei Gruppen gleich hoch. Aufgrund der Abhängigkeit von der Zellzahl stieg die CL-Aktivität / ml Milch jedoch von Gruppe zu Gruppe an.

Die relativ hohe CL-Aktivität trotz niedriger Zellzahlen bot den Vierteln gesunder Tiere in Gruppe CL2/$_{T<100}$ mit einer CL-Aktivität / ml Milch von log 1,34 einen guten Infektionsschutz.

Die Gruppe CL2/$_{V<100}$ beinhaltete gesunde Viertel kranker Kühe, deren hoher Infektionsschutz sich in der gestiegenen CL-Aktivität / ml Milch von log 1,87 ausdrückte.

Die erkrankten Viertel der Gruppe CL2/$_{V>100}$ hatten mit log 2,80 hohe CL-Aktivitäten / ml Milch. Da sich ihre CL-Aktivität / 1 Mio. PMN jedoch nicht von der gesunder Viertel unterschied, könnte die Abwehrkapazität der PMN dieser Tiere aufgrund chronischer Infektionen geschwächt gewesen sein.

Die Betrachtung der Gruppe CL2 unter Berücksichtigung des Zellzahlbefundes ließ erkennen, dass die CL-Aktivität von 3.000 bis 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN Viertel gesunder Tiere ebenso einschloss wie gesunde und kranke Viertel euterkranker Tiere. Die Einordnung dieser Gruppe als Übergangsbereich zwischen eindeutig gesunden und eindeutig erkrankten Eutervierteln bestätigte sich daher.

5.6.2.5 Folgerungen

Anhand der Gruppierung der Daten nach der CL-Aktivität in Milch ließ sich erkennen, dass die CL-Aktivität zwar von der Zellzahl in Milch abhängig ist, beide Parameter jedoch nicht gleichzusetzen sind. Vielmehr bietet die Interpretation der CL-Aktivität Informationen über den Gesundheitszustand, die sich aus dem Zellzahlbefund nicht ableiten lassen. Die Viertel der Gruppe CL1 mit niedriger CL-Aktivität (< 3.000 Einheiten / 1 Mio. PMN) waren eutergesund, während die Viertel der Gruppe CL3 (> 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN) auch anhand der Zellzahl im VAG und des Zelldifferentialbildes in der Milchzellsuspension als euterkrank beurteilt werden konnten. 6.000 CL-Einheiten / 1 Mio. PMN in Milch scheinen einen Grenzwert darzustellen, oberhalb dessen Infektionen vorliegen.

Vermutlich im Bereich von 3.000 bis 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN in Milch (Gruppe CL2) beginnen die Abwehraktivitäten gegen Erreger. Die mittlere Zellzahl der Gruppe CL2 von 80.000 Zellen / ml VAG lag dicht unter dem anerkannten Grenzwert von 100.000 Zellen / ml Milch (HAMANN u. FEHLINGS 2002) und innerhalb des in Abschnitt 5.6.1 vermuteten kritischen Bereiches von 50.000 bis 200.000 Zellen / ml Milch. In dieser Gruppe fanden sich Viertel eutergesunder Tiere, deren relativ hohe CL-Aktivität auf einen Entzündungsherd außerhalb des Euters schließen ließ. Ebenso waren gesunde Viertel vertreten, die durch benachbarte erkrankte Viertel eine hohe CL-Aktivität und einen hohen Anteil PMN in Milch aufwiesen. Die euterkranken Viertel in dieser Gruppe hatten vermutlich eine unzureichende systemische Abwehrlage.

5.6.3 Zusammenfassende Beurteilung

Die Beurteilung der Eutergesundheit auf Viertelebene befasste sich mit der Einordnung der Zelldifferenzierung und der Zellaktivität von Milchzellsuspensionen in gegebene Zellzahlgrenzwerte aus Milch. Dabei wurde festgestellt, dass es sinnvoller erscheint, statt eines Grenzwertes von 100.000 Zellen / ml Milch einen Übergangsbe-

reich geringgradiger Erkrankung von etwa 50.000 bis 200.000 Zellen / ml Milch anzunehmen.

Sowohl der Anteil PMN als auch die CL-Aktivität stiegen kontinuierlich mit der Anzahl somatischer Zellen an, ohne dabei feste Schwellenwerte zwischen gesund und krank erkennen zu lassen. Ein breites Spektrum von 3.000 bis 6.000 CL-Einheiten / 1 Mio. PMN in Milch zwischen eindeutig gesunden und eindeutig kranken Eutervierteln stimmt ungefähr mit dem oben genannten Zellzahlbereich überein und eröffnet die Möglichkeit, die CL-Aktivität / ml Milch von log 1,5 bis 2,5 als kritische Höhe zu betrachten. Tabelle 89 fasst mögliche Grenzbereiche für die verschiedenen Parameter zusammen.

Anhand des Anteils PMN im Zelldifferentialbild und der Zellfunktionalität konnte festgestellt werden, dass in der Gruppe mit 50.000 bis 200.000 Zellen / ml Milch gesunde und kranke Viertel euterkranker Tiere wie auch Viertel gesunder Tiere vertreten waren. Um die Eutergesundheit von Vierteln mit einer Zellzahl zwischen 50.000 und 200.000 Zellen / ml Milch genau beurteilen zu können, ist die zusätzliche Berücksichtigung des Differentialzellbildes und der CL-Aktivität des betroffenen wie auch der benachbarten Viertel dieses Tieres nötig.

Tabelle 89: Kritische Bereiche der Zellzahl in Milch und der CL-Aktivität von Milch-PMN in Bezug auf den Beginn entzündlicher Veränderungen

SCC in 1.000 / ml	CL-Aktivität / 1 Mio. PMN	log CL-Aktivität / ml Milch
50 – 200	3.000 – 6.000	1,5 – 2,5

5.7 Forschungsergebnisse der eigenen Untersuchungen

Abbildung 25 zeigt schematisiert die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

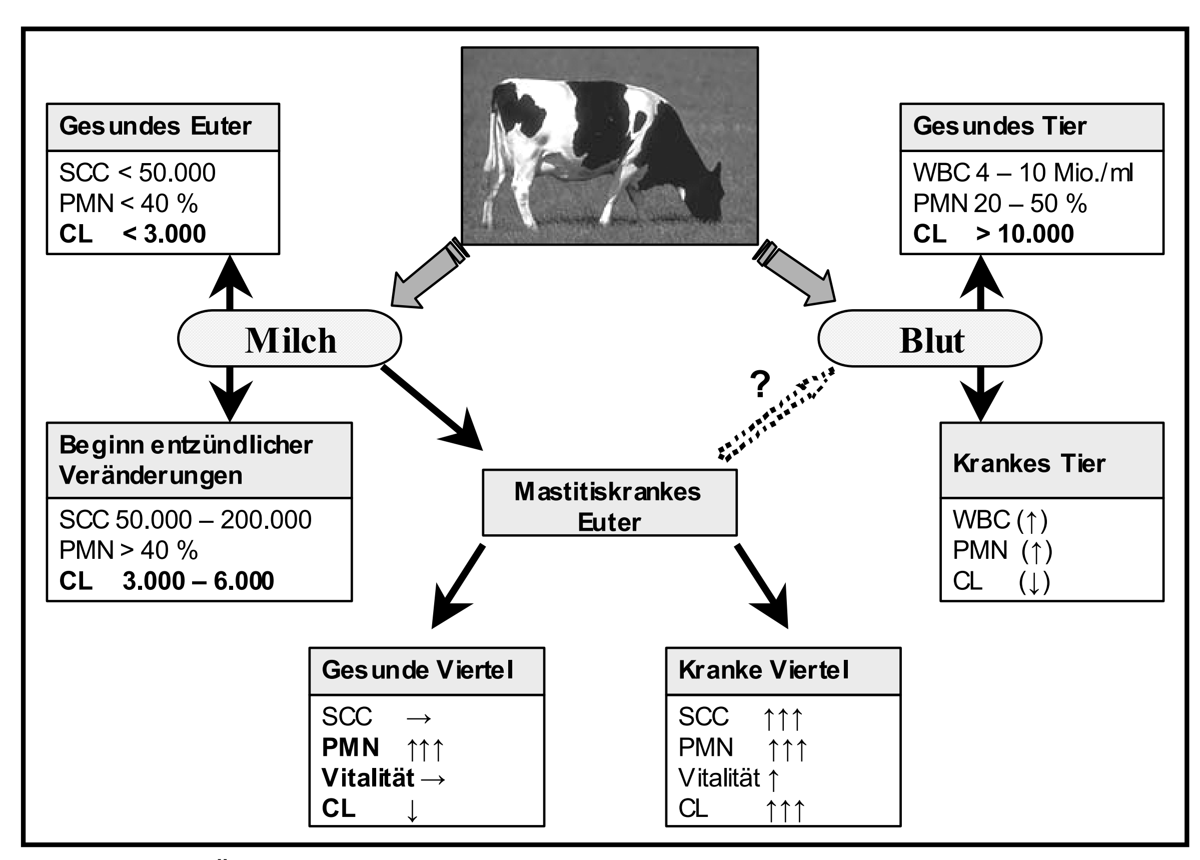


Abbildung 25: Übersicht über die Zusammenhänge der untersuchten Parameter in Hinsicht auf Mastitisgeschehen;
SCC: Anzahl somatischer Zellen / ml VAG; WBC: Leukozyten / ml Blut; PMN: Anteil PMN in Blut bzw. Milchzellsuspension; CL: CL-Aktivität / 1 Mio. PMN

Die gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Blutparameter WBC, PMN-Anteil im Blutausstrich und CL-Aktivität Blut auf die Entstehung einer Mastitis reagieren, auch wenn dies statistisch nicht nachgewiesen werden konnte. In einem allgemeingesunden Organismus liegen WBC und der PMN-Anteil im Blut innerhalb ihrer bekannten Referenzbereiche (KRAFT u. DÜRR 1997) sowie die CL-Aktivität über 10.000 Einheiten / 1 Million PMN. Erkrankt ein Tier, so steigen WBC und der Anteil PMN (KRAFT u. DÜRR 1997). Tendenziell konnte ein Absinken der CL-Aktivität festgestellt werden.

Im Medium Milch konnten Zusammenhänge zwischen funktionellen Zelleigenschaften und dem Gesundheitszustand des Euterviertels statistisch abgesichert werden. Milch aus gesunden Vierteln enthält unter 100.000 Zellen / ml Milch (HAMANN u. FEHLINGS 2002) und einen PMN-Anteil im Zelldifferentialbild unter 40 % (z. B. PAAPE et al. 1981a; WEVER u. EMANUELSON 1989; SCHRÖDER 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellzahlgrenzwert von 50.000 Zellen / ml Milch angenommen und festgestellt, dass die CL-Aktivität in gesunden Eutervierteln unter 3.000 Einheiten / 1 Mio. PMN lag.

HAMANN und FEHLINGS (2002) betonten, dass „bei 100.000 Zellen / ml Milch die normale zelluläre Abwehr in eine entzündliche Reaktion überzugehen beginnt“. Die Annahme einer Übergangszone zwischen gesund und krank wurde in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und bestätigt. Der Bereich zwischen 50.000 und 200.000 Zellen / ml Milch wurde als Beginn entzündlicher Veränderungen definiert, in dem der PMN-Anteil bereits über 40 % und die CL-Aktivität 3.000 – 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN betrug.

Bei Vorliegen einer Mastitis lassen sich neben einer bakteriologisch positiven Untersuchung stark erhöhte Zellzahlen (bis zu mehreren Millionen Zellen / ml Milch) (HAMANN u. FEHLINGS 2002) sowie ein sehr hoher Anteil PMN im Zelldifferentialbild nachweisen (bis über 90 %) (z. B. PAAPE et al. 1981a). Die Zellaktivität steigt ebenfalls stark an. Dies ist aus der Literatur bekannt (z. B. LOHUIS et al. 1990; LILIUS u. PESONEN 1990; PAAPE et al. 1990a, 1990b; KREMER et al. 1993; DOSOGNE et al. 1997; MEHRZAD 2002) und konnte in den eigenen Untersuchungen wiederholt festgestellt werden.

Die Reaktion nicht betroffener Viertel erkrankter Tiere wurde jedoch bisher nur von SCHRÖDER (2003) beschrieben: Der PMN-Anteil in der Milchzellsuspension steigt in diesen Eutervierteln ebenfalls signifikant an. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem ein Abfall der CL-Aktivität in den gesunden Vierteln kranker Kühe beobachtet. Damit konnte eine gegenseitige Abhängigkeit der Euterviertel eines Tieres nachgewiesen werden, auch wenn die zugrunde liegenden immunologischen Reaktionen noch nicht bekannt sind. Eine Arbeit zu diesem Themenkreis steht noch aus.

Roswitha Merle: Beziehungen zwischen Eutergesundheit und Funktionalität von aus Blut und Milch isolierten Leukozyten des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der Chemilumineszenz

6. Zusammenfassung

Die Diagnostik von Mastitiden schließt neben der zytobakteriologischen Untersuchung zunehmend die Analyse der Zelldifferentialbildes sowie der Zellfunktionalität aus Milch mit ein. Die Chemilumineszenzmessung (CL) ist ein Verfahren zur Bestimmung der Zellfunktionalität von PMN aus Blut, das seit einiger Zeit auch an PMN aus Milch durchgeführt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eutergesundheit, welche anhand von Bakteriologie, Anzahl somatischer Zellen (SCC), elektrischer Leitfähigkeit und NAGase kategorisiert wurde, mit den funktionellen Nachweisverfahren Phagozytose und Chemilumineszenz von PMN aus Blut und aus Milch sowie dem mikroskopischen Zelldifferentialbild aus Milch in Zusammenhang gebracht.

Im Rahmen methodischer Untersuchungen zur Bestimmung der CL-Aktivität im Luminometer wurde die Vorgehensweise wie folgt optimiert:

- Isolation und Lagerung der Zellen auf Eis, eine bis maximal sechs Stunden
- Zellkonzentration: 4 x 10^6 Zellen / ml
- PMA-Konzentration: 750 ng PMA / ml
- pH-Wert: 10,0

Der Vergleich gesunder Tiere mit Tieren, die auf allen Eutervierteln erkrankt waren, sowie mit solchen, die auf ein bis drei Vierteln erkrankt waren (Versuch 1), zeigte, dass die Funktionalitätsbestimmung von Blut-PMN zwar die Allgemeingesundheit der Tiere beschreibt, aber nicht ausreicht, um den Eutergesundheitszustand zu beurteilen. Die Untersuchung von Viertelgemelken zur Feststellung des Eutergesundheitsstatus ist unentbehrlich.

In einer wöchentlichen Verlaufsuntersuchung über die ersten drei Laktationsmonate (Versuch 2) wurden drei eutergesunde sowie drei kranke Tiere einbezogen. Die gesunden Tiere wiesen im Laktationsverlauf neben einer konstanten Zellzahl und einem von Lymphozyten dominierten Zelldifferentialbild in Milch geringfügig steigende Tendenzen in der Phagozytose- (von ca. 45 % auf etwa 60 % aktive Zellen in den nicht opsonisierten Proben) und der CL-Aktivität (von etwa 1.000 bis ca. 4.000 Einheiten / 1 Mio. PMN) der Milchzellsuspensionen auf.

Die Tiere, die an Mastitis erkrankten, hatten zwar nur in den betroffenen Eutervierteln erhöhte Zellzahlen (ca. 200.000 Zellen / ml Milch), der Anteil PMN im Zelldifferentialbild sowie die funktionelle Aktivität der Zellen in Milch stiegen jedoch auch in den benachbarten Vierteln, allerdings weniger ausgeprägt. Nach Abklingen der Mastitis blieben der PMN-Anteil und die funktionelle Aktivität im Vergleich zu den gesunden Tieren erhöht, bestehen blieben auch die abweichenden Zelldifferentialbilder und Zellaktivitäten zwischen den gesunden und den kranken Vierteln der erkrankten Tiere.

Im Rahmen einer Beurteilung der Eutergesundheit auf Tierebene an 36 Tieren (Versuch 3) wurde mit zunehmendem Krankheitsgeschehen (Zellzahlanstieg) ein Anstieg des PMN-Anteils von 29 % auf 72 % und der CL-Aktivität von ca. 5.000 auf etwa 8.800 Einheiten / 1 Mio. PMN in den Milchzellsuspensionen festgestellt, obwohl meist nur ein Euterviertel pro Tier erkrankt war. Die aus Blut gewonnenen Daten (Leukozytenzahl, Zelldifferentialbild, CL-Aktivität) befanden sich, soweit vorhanden, innerhalb ihrer Referenzwerte und unterschieden sich nicht zwischen den gebildeten Gruppen, sodass alle Tiere als allgemeingesund betrachtet werden konnten.

Die differenzierte Auswertung betroffener und nicht betroffener Viertel euterkranker Tiere ließ eine Abhängigkeit der Euterviertel eines Tieres voneinander erkennen. Durch systemische Einflüsse hatten die gesunden Viertel kranker Kühe im Vergleich zu den Vierteln gesunder Tiere einen hohen Anteil PMN in Milch (38 %), aber eine niedrigere CL-Aktivität (ca. 2.600 Einheiten / 1 Mio. PMN). Die dabei zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge konnten nicht grundsätzlich geklärt werden. Auch im Bereich entzündlicher Veränderungen oberhalb von 100.000 Zellen / ml

Milch stiegen der PMN-Anteil und die Zellaktivität in der Milchzellsuspension von mittelgradig (SCC 100.000 – 400.000 Zellen / ml) zu hochgradig (SCC > 400.000 Zellen / ml) erkrankten Eutervierteln an. Vermutlich aufgrund unterschiedlicher lokaler Abwehrkomponenten in der Milch (Mediatoren) variierten die Zelldifferentialbilder und die funktionellen Zelleigenschaften gesunder und kranker Viertel derselben Tiere stark.

Die Einteilung der Daten anhand der zytobakteriologischen Ergebnisse zeigte, dass das Zelldifferentialbild sowie die Zellfunktionalität stärker von der Zellzahl als vom bakteriologischen Status beeinflusst werden.

Die Beurteilung der Eutergesundheit auf Viertelebene (n = 171 Viertel) ließ erkennen, dass die Zellaktivität in Milch mit zunehmender Zellzahl stieg. Dabei schien es geeignet, den Zellzahlbereich zwischen 50.000 und 200.000 Zellen / ml Milch als Beginn entzündlicher Veränderungen zu betrachten, da auch die Zelldifferenzierung und die Zellfunktionalität in diesem Bereich kontinuierliche Veränderungen aufwiesen. 3.000 bis 6.000 CL-Einheiten / 1 Mio. PMN in Milch stellten beginnende Abwehrreaktionen im Euterviertel dar, während CL-Aktivitäten in Milch über 6.000 Einheiten / 1 Mio. PMN auf die Manifestation einer Eutererkrankung schließen ließ. Diese Werte stimmten mit den oben genannten Zellzahlen und einem Anstieg des PMN-Anteils in der Milchzellsuspension überein.

Die Einordnung funktioneller Eigenschaften von PMN aus Blut und Milch in die Parameter der Eutergesundheit sowie die Zelldifferenzierung aus Milch ließ steigende Zellaktivitäten im Zusammenhang mit einem Mastitisgeschehen bereits dann erkennen, wenn der Zellzahlbefund selbst wenig auf entzündliche Vorgänge hinwies. Zudem wurde ein deutlicher funktioneller Einfluss kranker Viertel auf die nicht betroffenen benachbarten Viertel nachgewiesen.

Roswitha Merle: Relationships between udder health and functionality of bovine blood and milk leucocytes with special regard to the chemiluminescence

7. Summary

The diagnosis of mastitis has been extended beyond cytobacteriology to the analysis of differential cell counts along with the cell functionality of milk. The chemiluminescence (CL) is a procedure for determining PMN functionality in blood, sometimes also used for milk PMN.

In the present work the udder health categorised by means of bacteriology, somatic cell counts (SCC), electrical conductivity and NAGase, was evaluated by functional methods, i. e. phagocytosis and chemiluminescence of blood and milk PMN as well as the microscopic cell differentiation of milk.

Regarding methodic investigations for the determination of the CL activity in a luminometer, the procedure was optimized as follows:

- Isolation and storage of the cells on ice, by a maximum of six hours
- Cell concentration: 4×10^6 cells / ml
- PMA concentration: 750 ng PMA / ml
- pH-value: 10.0

The comparison of healthy animals with animals who were sick on all udder quarters as well as those that had fallen ill on one to three quarters (experiment 1), showed that the determination of the functionality of blood PMN is not sufficient to judge the udder health state, though it describes the general health of the animals. Analysis of quarter milk for the determination of the health status is therefore indispensable.

In a weekly trial over the first three months of lactation (experiment 2), three udder healthy as well as three diseased animals were included. During lactation healthy animals showed a constant cell count in milk with a differential cell count dominated by lymphocytes in milk and slightly increasing tendencies in phagocytosis (from

approx. 45 % to about 60 % cells in the non opsonisized tests) and CL activity (from approx. 1,000 to approx. 4,000 units / 1 million PMN) in the milk cell suspensions.

While within the diseased animals higher cell counts were closely linked to mastitic quarters only (approx. 200,000 cell / ml), increased PMN fractions in differential cell counts and functional activity were also observed in neighouring quarters, although not as marked as in the diseased ones. After convalescence the PMN fraction and the functional activity remained high compared to the healthy animals and the differences between the healthy and the sick quarters of diseased cattles also persisted.

Within classification of udder health on animal level of 36 animals (experiment 3), a rise in the PMN fraction from 29 % to 72 % and in the CL activity from approx. 5,000 to about 8,800 units / 1 million PMN in the milk cell suspensions was found in association with increasing cell numbers, although in most cases only one udder quarter per animal was affected. Data from blood (number of leucocytes, cell differential count, CL activity) ranged, if available, within their reference values and did not differ between the groups, so all animals could be considered generally healthy.

The evaluation of data from affected and unaffected quarters of udder-diseased animals revealed a mutual influence within udder quarters from one animal. By systemic influences the healthy quarters of sick cows compared to the quarters of healthy animals presented a high PMN fraction in milk (38 %), but a lower CL capacity (approx. 2,600 units / 1 million PMN). The underlying immunological processes could not be clarified completely. Considering inflammable changes above 100,000 cells / ml milk both the PMN fraction and the cell activity in the milk cell suspensions rised from moderately (SCC 100,000 – 400,000 cells / ml) to seriously (SCC > 400,000 cells / ml) diseased udder quarters. Cell differential counts and functional cell activities of healthy and diseased quarters in the same cows varied probably because of different local defensive components in milk (mediators).

The categorisation of the data by cytobacteriologically means showed that the cell differentiation as well as the cell functionality were influenced more by the cell count than by the bacteriological status.

The evaluation of udder health on quarter level (n = 171 quarters) made clear that the cell activity in milk was enhanced with increasing cell counts in milk. The cell counts between 50,000 and 200,000 cells / ml milk were considered to be a beginning of inflammatory changes in the udder since changes in cell differentiation and cell functionality were observed continuously from this cell count level on. 3,000 to 6,000 CL units / 1 million PMN in milk represented the beginning of defence reactions in the udder quarter, while CL activities in milk > 6,000 units / 1 million PMN are likely to be indicative of an udder illness. These values corresponded to the above-mentioned cell counts and to a rise of the PMN fraction in the milk cell suspension.

The evaluation of blood and milk cell functionality in parameters of udder health an milk cell differentiation showed positive effects on udder health catgorization even when commonly-empolyed diagnostic procedures yielded little evidence of inflammation. Moreover, a clear functional influence of sick quarters to the unaffected neighbouring quarters was proven.

8. Quellenverzeichnis

ALLEN, R. C., U. L. D. LOOSE (1976):
Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69, 245 – 252

ALLEN, R. C., R. L. STJERNHOLM U. R. H. STEELE (1972):
Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participartion in bactericidal activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 679 – 684

ANGLE, M. J., U. P. H. KLESIUS (1983):
Luminol-dependent chemiluminescence analysis of the variables of the phagocytic response by canine granulocytes.
Vet. Immunol. Immunopathol. 4, 333 – 344

ARNAOUT, M. A. (1990):
Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18.
Blood 75, 1037 – 1050

BABIOR, B. M. (1984):
Oxidants from phagocytes: agents of defence and destruction.
Blood 64, 959 – 966

BASS, D. A., J. W. PARCE, L. R. DECHATELET, P. SZEJDA, M. C. SEEDS U. M. THOMAS (1983):
Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation.
J. Immunol. 130, 1910 – 1917

BENSINGER, R., U. C. M. JOHNSON (1981):
Luminol assay for superoxide dismutase.
Anal. Biochem. 116, 142 – 145

BICKHARDT, K. (1992):
Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte.
Verlag Parey, Berlin, Hamburg

BRIHEIM, G., O. STENDAHL U. C. DAHLGREN (1984):
Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes.
Infect. Immun. 45, 1 – 5

BROLIN, S., U. G. WETTERMARK (1992):
Bioluminescence analysis.
Verlag VCH, Weinheim

BURVENICH, C., A. J. GUIDRY U. M. J. PAAPE (1995):
Natural defence mechanisms of the lactating and dry mammary gland.
in: 3rd IDF Int. Mastitis Seminar, Tel Aviv, Israel, Kongressbericht, 3 – 13

BURVENICH, C., M. J. PAAPE, A. W. HILL, A. J. GUIDRY, R. H. MILLER, R. HEYNEMAN, W. D. J. KREMER U. A. BRAND (1994):
Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving.
Vet. Q. 16, 45 – 49

CARLSON, G. P., U. J. J. KANEKO (1973):
Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 853 – 856

CHESON, B. D., R. L. CHRISTENSEN, R. SPERLIN, B. E. KOHLER U. B. M. BABIOR (1976):
The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes.
J. Clin. Invest. 58, 789 – 796

CONCHA, C. (1986):
Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions – a review of the literature.
Nord. Vet. – Med. 38, 257 – 272

CONCHA, C., O. HOLMBERG U. B. MOREIN (1978):
Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk.
J. Dairy Res. 45, 287 – 290

COORAY, R. (1994):
Use of bovine myeloperoxidase as an indicator of mastitis in dairy cattle.
Vet. Microbiol. 42, 317 – 326

COORAY, R. (1996):
Casein effects on the myeloperoxidase-mediated oxygen-dependent bactericidal activity of bovine neutrophils.
Vet. Immunol. Immunopathol. 51, 55 – 65

COORAY, R., C. G. B. PETERSSON U. O. HOLMBERG (1993):
Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules.
Vet. Immunol. Immunopathol. 38, 261 – 272

CRAVEN, C., U. M. R. WILLIAMS (1985):
Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement.
Vet. Immunol. Immunopathol. 10, 71 – 127

DAHLGREN, C., u. O. STENDAHL (1982):
Effect of in vitro preincubation of polymorphonuclear leukocytes on formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced chemiluminescence.
Infect. Immun. 37, 34 – 39

DAHLGREN, C., u. O. STENDAHL (1983):
Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes.
Infect. Immun. 39, 736 – 741

DALEY, M. J., E. R. OLDHAM, T. J. WILLIAMS u. P. A. COYLE (1991):
Quantitative and qualitative properties of host polymorphonuclear cells during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in cows.
Am. J. Vet. Res. 52, 474 – 479

DECHATELET, L. R., C. J. LEES, C. E. WALSH, G. D. LONG u. S. P. SHIRLEY (1982):
Comparison of the calcium ionophore and phorbol myristate acetate on the initiation of the respiratory burst in human neutrophils.
Infect. Immun. 38, 969 – 974

DECHATELET, L. R., u. S. P. SHIRLEY (1982):
Chemiluminescence of human neutrophils induced by soluble stimuli: effect of divalent cations.
Infect. Immun. 35, 205 – 212

DETILLEUX, J. C., M. E. KEHRLI, JR., J. R. STABEL, A. E. FREEMAN u. D. H. KELLEY (1995):
Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production.
Vet. Immunol. Immunopathol. 44, 251 – 267

DOGGWEILER, R., u. E. HESS (1983):
Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter.
Milchwissensch. 38, 5 – 8

DOSOGNE, H., C. BURVENICH, A. E. FREEMAN, M. E. KEHRLI JR., J. C. DETILLEUX, J. SULON, J.-F. BECKERS U. D. HOEBEN (1999):
Pregnancy-associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leukocyte function in early post-partum dairy cows.
Vet. Immunol. Immunopathol. 67, 47 – 54

DOSOGNE, H., C. BURVENICH, T. VAN WERVEN, E. ROETS, E. N. NOORDHUIZEN-STASSEN U. B. GODDEERIS (1997):
Increased surface expression of CD 11b receptors on polymorphonuclear leukocytes is not sufficient to sustain phagocytosis during *Escherichia coli* mastitis in early post-partum dairy cows.
Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 47 – 59

DOSOGNE, H., F. VANGROENWEGHE, J. MEHRZAD, A. M. MASSART-LEEN U. C. BURVENICH (2003):
Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk.
J. Dairy Sci. 86, 828 – 834

DULIN, A. M., M. J. PAAPE U. S. C. NICKERSON (1988):
Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows.
Am. J. Vet. Res. 49, 172 – 177

DULIN, A. M., M. J. PAAPE U. B. T. WEINLAND (1984):
Determination of phagocytosis of ^{32}P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine polymorphonuclear leukocytes.
Am. J. Vet. Res. 45, 786 – 789

EASMON, C. S. F., P. J. COLE, A. J. WILLIAMS U. M. HASTINGS (1980):
The measurement of opsonic and phagocytic function by Luminol-dependent chemiluminescence.
Immunology 41, 67 – 74

EBERHART, R. J., R. P. NATZKE, F. H. S. NEWBOULD, B. NONNECKE U. P. THOMPSON (1979):
Coliform mastitis - a review.
J. Dairy Sci. 62, 1 – 22

FOX, L. K., U. J. S. MCDONALD (1988):
Functional activity of neutrophils from bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*.
J. Dairy Sci. 71, 3521 – 3524

FOX, L. K., J. S. MCDONALD, J. K. HILLERS U. L. B. CORBEIL (1988):
Function of phagocytes obtained from lacteal secretions of lactating and nonlactating cows.
Am. J. Vet. Res. 49, 678 – 681

FOX, L. K., G. E. SHOOK U. L. H. SCHULTZ (1985):
Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts.
J. Dairy Sci. 68, 2100 – 2107

GENNARO, R., L. DOLZANI U. D. ROMEO (1983):
Potency of bactericidal proteins from the large granules of bovine neutrophils.
Infect. Immun. 40, 684 – 690

GLASSER, L., U. R. L. FIEDERLEIN (1987):
Functional differentiation of normal human neutrophils.
Blood 69, 937 – 944

GRABOWSKI, N. T. (2000):
Körpergewichtsentwicklung, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender DSB-Kühe in Laufstallhaltung.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

GRABOWSKI, N. T., J. HAMANN U. V. KRÖMKER (2002):
Mastitis detection during the colostral phase by somatic cell count in quarter foremilk samples.
Milchwissensch. 57, 601 – 604

GRUNERT, E. (1996):
Buiatrik.
5. Aufl. Verlag Schaper, Hannover

GUIDRY, A. J., M. J. PAAPE, R. E. PEARSON U. W. F. WILLIAMS (1980):
Effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils.
Am. J. Vet. Res. 41, 1427 – 1431

HALLÉN SANDGREN, C. , U. I. BJÖRK (1988):
A rapid technique for the isolation of highly purified, functionally intact bovine neutrophilic granulocytes.
Vet. Immunol. Immunopathol. 18, 81 – 94

HALLÉN SANDGREN, C. , K. NORDLING U. I. BJÖRK (1991):
Isolation and phagocytic properties of neutrophils and other phagocytes from non-mastitic bovine milk.
J. Dairy Sci. 74, 2965 – 2975

HAMANN, J. (1992):
Zum Einfluß von Streßsituationen auf die Anzahl somatischer Zellen der Milch.
Prakt. Tierarzt, Sonderheft colleg. vet. 23, 38 – 41

HAMANN, J. (1995):
Herdensammelmilchzellzahlbeurteilung unter lebensmittelhygienischen und mastitispräventiven Gesichtspunkten.
Prakt. Tierarzt, Sonderheft colleg. vet. 25, 18 – 20

HAMANN, J., U. K. FEHLINGS (2002):
Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem.
4. Aufl. Verlag DVG, Gießen

HAMANN, J., U. J. REICHMUTH (1990):
Exogene Einflüsse auf den Zellgehalt der Milch unter Berücksichtigung des Gesundheitszustandes der Milchdrüse.
Milchwissensch. 45, 286 – 290

HAMANN, J., H. STAHLHUT-KLIPP, V. KRÖMKER U. P. GYODI (1997):
Milchqualität: Variationen majorer und minorer Milchinhaltsstoffe.
in: 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Dtsch. Veterinärmed. Ges., Garmisch-Partenkirchen 1997 Ber., 214 – 219

HAMANN, J., U. A. ZECCONI (1998):
Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator.
Bulletin of the IDF 334, 5 – 22

HEYNEMAN, R., C. BURVENICH U. R. VERCAUTEREN (1990):
Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *E. coli* mastitis in cows.
J. Dairy Sci. 73, 985 – 994

HOEBEN, D (1999):
Pathogenesis of *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis* mastitis around parturition: role of the activity of bone marrow derived and circulating leukocytes with regard to possible hormonal and pharmacological influences.
Ghent/B, Faculty of Veterinary Medicine, Diss.

HOEBEN, D., C. BURVENICH U. R. HEYNEMAN (1998):
Antibiotics commonly used to treat mastitis and respiratory burst of bovine polymorphonuclear leukocytes.
J. Dairy Sci. 81, 403 – 410

HOEBEN, D., R. HEYNEMAN U. C. BURVENICH (1997):
Elevated levels of ß-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils.
Vet. Immunol. Immunopathol. 58, 165 – 170

HOEBEN, D., E. MONFARDINI, C. BURVENICH U. J. HAMANN (2000A):
Treatment of acute *Escherichia coli* mastitis in cows with enrofloxacin: effect on clinical signs and chemiluminescence of circulating neutrophils.
J. Dairy Res. 67, 485 – 502

HOEBEN, D., E. MONFARDINI, G. OPSOMER, C. BURVENICH, H. DOSOGNE, A. DE KRUIF U. J.-F. BECKERS (2000B):
Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein.
J. Dairy Res. 67, 249 – 259

HOLMBERG, O., U. C. CONCHA (1985):
The function of leucocytes in mammary secretion.
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. 37, 458 – 461

HUBER, A. R., S. L. KUNKEL, R. F. TODD U. S. J. WEISS (1991):
Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8.
Science 254, 99 – 102

HUU, T. P., C. MARQUETTY, C. PASQUIER U. J. HAKIM (1984):
Luminol assay for microdetermination of superoxide dismutase activity: its application to human fetal blood.
Anal. Biochem. 142, 467 – 472

JAIN, N. C. (1976):
Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland.
Theriogenology 6, 153 – 173

JAIN, N. C., U. J. LASMANIS (1977):
Phagocytosis of serum-resistant and serum-sensitive coliform bacteria (*Klebsiella*) by bovine neutrophils from blood and mastitic milk.
Am. J. Vet. Res. 39, 425 – 427

KEHRLI, M. E., U. J. P. GOFF (1989):
Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function.
J. Dairy Sci. 72, 1188 – 1196

KEHRLI, M. E., B. J. NONNECKE U. J. A. ROTH (1989):
Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period.
Am. J. Vet. Res. 50, 207 – 214

KIMURA, K., J. P. GOFF U. M. E. KEHRLI (1999):
Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows.
J. Dairy Sci. 82, 2385 – 2392

KIMURA, K., J. P. GOFF, M. E. KEHRLI U. T. A. REINHARDT (2002):
Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 85, 544 – 550

KITCHEN, B. J. (1981):
Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests.
J. Dairy Res. 48, 167 – 188

KITCHEN, B. J., G. MIDDLETON U. M. SALMON (1978):
Bovine milk N-acetyl-ß-D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions.
J. Dairy Res. 45, 15 – 20

KLINKE, R., U. S. SILBERNAGL (1994):
Lehrbuch der Physiologie.
Verlag Thieme, Stuttgart, New York

KLUCIŃSKI, W., A. DEGÓRSKI, E. MIERNIK-DEGÓRSKA, S. TARGOWSKI U. A. WINNICKA (1988):
Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes.
J. Vet. Med. A 35, 632 – 639

KRAFT, W., U. U. M. DÜRR (1997):
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.
4. Aufl. Verlag Schattauer, Stuttgart

KREMER, W. D. J., E. N. NOORDHUIZEN-STASSEN, F. J. GROMMERS, A. J. J. M. DAEMEN, P. A. J. HENRICKS U. A. BRAND (1993):
Preinfection chemotactic response of blood polymorphonuclear leukocytes to predict severity of *E. coli* mastitis.
J. Dairy Sci. 76, 1568 – 1574

KURZHALS, P., H. KLIMA U. D. MANZ (1985):
Beziehungen zwischen Zellzahl, Zellbild und bakteriologischen Befunden bei der subklinischen Mastitis des Rindes.
Milchwissensch. 40, 6 – 8

KWON, M. S. (1987):
Vergleichende Untersuchungen neutrophiler Granulozyten.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

LEE, C.-S., F. B. P. WOODING U. P. KEMP (1980):
Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows.
J. Dairy Res. 47, 39 – 50

LEITNER, G., E. SHOSHANI, O. KRIFUCKS, M. CHAFFER U. A. SARAN (1999):
Milk leucocyte population in bovine udder infection of different aetiology.
J. Vet. Med. B 47, 581 – 589

LILIUS, E.-M., U. U. PESONEN (1990):
Use of inflammatory cell activities in bovine milk to diagnose mastitis.
Am. J. Vet. Res. 51, 1527 – 1533

LOHUIS, J. A. C. M. , Y. H. SCHUKKEN, P. A. J. HENRICKS, R. HEYNEMAN, C. BURVENICH, J. H. M. VERHEIJDEN, A. S. J. P. A. M. VAN MIERT U. A. BRAND (1990):
Preinfection functions of blood polymorphonuclear leukocytes and the outcome of experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow.
J. Dairy Sci. 73, 342 – 350

MEHRZAD, J. (2002):
Respiratory burst activity and viability of bovine blood and milk neutrophils during different stages of lactation and mastitis.
Ghent/B, Faculty of Veterinary Medicine, Diss.

MEHRZAD, J., H. DOSOGNE, E. MEYER U. C. BURVENICH (2001A):
Local and systemic effects of endotoxin mastitis on the chemiluminescence of milk and blood neutrophils in dairy cows.
J. Vet. Res. 32, 131 – 144

MEHRZAD, J., H. DOSOGNE, E. MEYER, R. HEYNEMAN U. C. BURVENICH (2001B):
Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation.
J. Dairy Res. 68, 399 – 415

MEHRZAD, J., L. DUCHATEAU, S. PYÖRÄLÄ U. C. BURVENICH (2002):
Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation.
J. Dairy Sci. 85, 3268 – 3276

MILLER, R. H., A. J. GUIDRY, M. J. PAAPE, A. M. DULIN u. L. A. FULTON (1988):
Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils.
Am. J. Vet. Res. 49, 42 – 45

MILLER, R. H., M. J. PAAPE u. L. A. FULTON (1991):
Variation in milk somatic cell of heifers at first calving.
J. Dairy Sci. 74, 3782 – 3790

MOTTOLA, C., R. GENNARO, A. MARZULLO u. D. ROMEO (1980):
Isolation and partial characterization of the plasma membrane of purified bovine neutrophils.
Eur. J. Biochem. 111, 341 – 346

MULLAN, N. A., E. A. CARTER u. K. A. T. NGUYEN (1986):
Secretion of hydrogen peroxide by phagocytic cells from bovine non-lactating mammary glands.
Res. Vet. Sci. 41, 265 – 370

NAGAHATA, H., S. MAKINO, S. TAKEDA, H. TAKAHASHI u. H. NODA (1988):
Assessment of neutrophil function in the dairy cow during the perinatal period.
J. Vet. Med. B 35, 747 – 751

NAGAHATA, H., S. TAKEDA, N. SAITO u. H. NODA (1988):
The use of luminol-dependent chemiluminescence assay for monitoring the phagocytic and opsonic activity in bovine whole blood.
Br. Vet. J. 144, 158 – 165

NAIDU, T. G., u. F. H. S. NEWBOULD (1973):
Glycogen in leukocytes from bovine blood and milk.
Can. J. comp. Med. 37, 47 – 55

NEWBOULD, F. H. S. (1970):
Enhancement of phagocytosis in bovine milk leukocytes in vitro.
Can. J. comp. Med. 34, 261 – 264

NEWBOULD, F. H. S. (1973):
The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows.
Can. J. comp. Med. 37, 189 – 194

NOGAI, K., V. KRÖMKER, P. GYODI U. J. HAMANN (1996):
Zur fluoreszenzspektroskopischen und photometrischen Bestimmung von N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase in Milch – ein Methodenvergleich.
in: 37. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, 299 – 306

ÖSTENSSON, K. (1993):
Trafficing of leukocytes and immunoglobulin isotypes in the bovine udder.
Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Diss.

ÖSTENSSON, K., M. HAGELTORN U. G. ÅSTRÖM (1988):
Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows.
Acta vet. scand. 29, 493 – 500

OUTTERIDGE, P. M., U. C. S. LEE (1981):
Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages.
Adv. Exp. Med. Biol. 137, 513 – 534

PAAPE, M. J., A. J. GUIDRY, S. T. KIRK U. D. J. BOLT (1975):
Measurement of phagocytosis of ^{32}P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream.
Am. J. Vet. Res. 36, 1737 – 1743

PAAPE, M. J., u. R. H. MILLER (1988):
Sources of variation introduced into a phagocytosis assay as a result of the isolation of neutrophils from bovine blood.
Am. J. Vet. Res. 49, 1210 – 1213

PAAPE, M. J., R. H. MILLER u. G. ZIV (1990A):
Effects of florfenicol, chloramphenicol and thiamphenicol on phagocytosis, chemiluminescence and morphology of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes.
J. Dairy Sci. 73, 1734 – 1744

PAAPE, M. J., S. C. NICKERSON u. G. ZIV (1990B):
In vivo effects of chloramphenicol, tetracycline, and gentamicin on bovine neutrophil function and morphologic features.
Am. J. Vet. Res. 51, 1055 – 1061

PAAPE, M. J., R. E. PEARSON u. W. D. SCHULTZE (1978):
Variation among cows in the ability of milk to support phagocytosis and in the ability of polymorphonuclear leukocytes to phagocytose *Staphylococcus aureus*.
Am. J. Vet. Res. 39, 1907 – 1910

PAAPE, M. J., R. E. PEARSON, W. P. WERGIN u. A. J. GUIDRY (1977):
Enhancement of chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes into the mammary gland and isolation from milk.
J. Dairy Sci. 60, 53 – 62

PAAPE, M. J., W. D. SCHULTZE u. A. J. GUIDRY (1985):
Development of natural defense mechanisms.
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. 37, 447 – 457

PAAPE, M. J., W. D. SCHULTZE, A. J. GUIDRY, W. M. KORTUM U. B. T. WEINLAND (1981B):
Effect of an intramammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocyte response to *Escherichia coli* endotoxin and challenge exposure with *Staphylococcus aureus*.
Am. J. Vet. Res. 42, 774 – 783

PAAPE, M. J., U. W. P. WERGIN (1977):
The leukocyte as a defense mechanism.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 170, 1214 – 1223

PAAPE, M. J., W. P. WERGIN, A. J. GUIDRY U. R. E. PEARSON (1979):
Leukocytes – second line of defense against invading mastitis pathogens.
J. Dairy Sci. 62, 135 – 153

PAAPE, M. J., W. P. WERGIN, A. J. GUIDRY U. W. D. SCHULTZE (1981A):
Phagocytic defense of the ruminant mammary gland.
Adv. Exp. Med Biol. 137, 555 – 578

PERSSON, K., I. LARSSON U. C. HALLÉN SANDGREN (1993):
Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro.
Vet. Immunol. Immunopathol. 37, 99 – 112

PUGET, K., U. A. M. MICHELSON (1974):
Iron containing superoxide dimutases from *luminous bacteria*.
Biochimie 56, 1255 – 1267

REDETZKY, R. (2000):
Biochemisches Blutprofil, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender HF-Kühe in Anbindehaltung.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

REICHMUTH, J. (1975):
Somatic cell counting – interpretation of results.
in: IDF-Bulletin Doc. 85, 93 – 109

RIOLLET, C., P. RAINARD u. B. POUTREL (2000):
Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland.
Adv. Exp. Med. Biol. 480, 247 – 258

ROSSI, F. (1986):
The O_2^--forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function.
Biochim. Biophys. Acta 853, 65 – 89

ROSSI, F., u. M. ZATTI (1964):
Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis.
Br. J. Exp. Pathol. 45, 549 – 559

ROTH, J. A., u. M. L. KAEBERLE (1981):
Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function.
Vet. Immunol. Immunopathol. 2, 157 – 174

ROTH, J. A., M. L. KAEBERLE, L. H. APPELL u. R. F. NACHREINER (1983):
Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function.
Am. J. Vet. Res. 44, 247 – 253

ROTHLEIN, R., M. L. DUSTIN, S. D. MARLIN u. T. A. SPRINGER (1986):
A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1.
J. Immunol. 137, 1270 – 1274

RUSSELL, M. W., B. E. BROOKER u. B. REITER (1977):
Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of Staphylococci in milk.
J. comp. Pathol. 87, 43 – 52

SAAD, A. M. (1987):
Flow cytometric measurement of bovine milk neutrophil phagocytosis.
Acta vet. scand. 28, 333 – 342

SAAD, A. M., u. M. HAGELTORN (1985):
Flow cytometric characterization of bovine blood neutrophil phagocytosis of fluorescent bacteria and zymosan particles.
Acta vet. scand. 26, 289 – 307

SALGAR, S. K., M. J. PAAPE, B. ALSTON-MILLS u. R. H. MILLER (1991):
Flow cytometric study of oxidative burst activity in bovine neutrophils.
Am. J. Vet. Res. 52, 1201 – 1206

SCHALM, O. W., E. J. CARROLL u. J. LASMANIS (1964):
The leukocyte barrier and serologic investigations of experimental coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle.
Am. J. Vet. Res. 25, 90 – 96

SCHALM, O. W., J. LASMANIS u. E. J. CARROLL (1966):
Significance of leukocytic infiltration into the milk in experimental *Streptococcus agalacatiae* mastitis in cattle.
Am. J. Vet. Res. 27, 1537 – 1546

SCHMIDT MADSEN, P. (1975):
Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk.
J. Dairy Res. 42, 227 – 239

SCHRÖDER, A. (2003):
Untersuchungen zum Zelldifferentialbild von Milch mit Hilfe monoklonaler Antikörper unter besonderer Berücksichtigung der Lymphozyten.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHULTZE, W. D. (1985):
Developments in the identification of diseased udder quarters or cows.
Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. 37, 319 – 328

SCHULTZE, W. D., U. M. J. PAAPE (1983):
Effect on outcome of intramammary challenge exposure with *Staphylococcus aureus* of somatic cell concentration and presence of an intramammary device.
Am. J. Vet. Res. 45, 420 – 423

SCHÜTTEL, M. (1999):
Vergleich von N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase-Aktivitäten (NAGase) in Milch, Blut und Harn beim laktierenden Rind.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SHUSTER, D., M. E. KEHRLI, P. RAINARD U. M. PAAPE (1997):
Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 65, 3286 – 3292

SHUSTER, D. E., E. K. LEE U. M. E. KEHRLI (1996):
Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation.
Am. J. Vet. Res. 57, 1569 – 1575

SILVA, I. D., N. C. JAIN U. L. W. GEORGE (1989):
Phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of mature and immature neutrophils and eosinophils from blood and bone marrow from cows.
Am. J. Vet. Res. 50, 778 – 781

SMITS, E., C. BURVENICH, A. J. GUIDRY, R. HEYNEMAN U. A. MASSART-LEËN (1999):
Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils.
Vet. Immunol. Immunopathol. 68, 169 – 176

SMITS, E., C. BURVENICH, A. J. GUIDRY U. A. MASSART-LEËN (2000):
Adhesion receptor CD11b/CD18b contributes to neutrophil diapedesis across the bovine blood-milk barrier.
Vet. Immunol. Immunopathol. 73, 255 – 265

SORDILLO, L. M., U. L. A. BABIUK (1991):
Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine interferon gamma.
Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 393 – 402

SORDILLO, L. M., K. SHAFER-WEAVER U. D. DEROSA (1997):
Immunology of the mammary gland.
J. Dairy Sci. 80, 1851 – 1865

SURIYASATHAPORN, W., Y. H. SCHUKKEN, M. NIELEN U. A. BRAND (2000):
Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd.
J. Dairy Sci. 83, 1248 – 1255

TARGOWSKI, S. P. (1983):
Role of immune factors in protection of mammary gland.
J. Dairy Sci. 66, 1781 – 1789

TOLLE, A. (1975):
Mastitis – the disease in relation to control methods.
IDF-Bulletin Doc. 85, 3 – 15

VANDEPUTTE-VAN MESSOM, G., C. BURVENICH, E. ROETS, A.-M. MASSART-LEËN, R. HEYNEMAN, W. D. J. KREMER U. A. BRAND (1993):
Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *E. coli* mastitis.
J. Dairy Res. 60, 19 – 29

VANGROENWEGHE, F., H. DOSOGNE, J. MEHRZAD U. C. BURVENICH (2001):
Effect of milk sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and function of resident cells in milk.
J. Vet. Res. 32, 565 – 579

VAN WERVEN, T., E. N. NOORDHUIZEN-STASSEN, A. J. J. M. DAEMEN, Y. H. SCHUKKEN, A. BRAND U. C. BURVENICH (1997):
Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*.
J. Dairy Sci. 80, 67 – 74

WEBER, L., E. PETERHANS U. R. WYLER (1983):
The chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood.
Vet. Immunol. Immunopathol. 4, 397 – 412

WESTRICK, M. A., P. S. SHIRLEY U. L. R. DECHATELET (1980):
Generation of chemiluminescence by human neutrophils exposed to soluble stimuli of oxidative metabolism.
Infect. Immun. 30, 385 – 390

WEVER, P., U. U. EMANUELSON (1989):
Effects of systematic influences and intramammary infection on differential and total somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows.
Acta vet. scand. 30, 465 – 474

WILLIAMS, M. R., N. CRAVEN, T. R. FIELD U. K. J. BUNCH (1985):
The relationship between phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils.
Br. Vet. J. 141, 362 – 371

ZECCONI, A., V. BRONZO, R. PICCININI, G. SPREAFICO U. G. RUFFO (1994):
Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leucocytes.
J. Dairy Res. 61, 271 – 279

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Hamann für die Überlassung des Themas und für die herausragende fachliche Betreuung, die durch sein außergewöhnliches Wissen von besonderer Qualität war.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Karl Nogai, Dr. Nils Grabowski und Dr. Ralf Redetzky danke ich dafür, dass sie jederzeit geduldige Ansprechpartner für Fragen aller Art waren und mir oft nützliche Hilfestellung boten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anke Schröder, die meinen Weg zunächst als Partnerin im Labor und später als wissenschaftliche Betreuerin engagiert und geduldig begleitete. Ihre zahlreichen Anregungen und ihre persönliche Kreativität haben mir oft gerade dann geholfen, wenn mir die Ideen ausgingen.

Ein großer Dank geht außerdem an Herrn Jürgen Falkenhagen und Herrn Manfred Krückeberg sowie an meine Mitdoktoranden Heidi Halm, Doris Klocke, Cordula Köss, Florian Pfannenschmidt und Astrid Sulzer, die mich alle bei meinen zahlreichen Probenentnahmen frühmorgens im Stall tatkräftig unterstützten.

Auch den Mitarbeitern des Lehr- und Forschungsgutes Ruthe und der Familie Meldau sei mein herzlichster Dank ausgesprochen, dass sie den erheblichen Arbeitsaufwand durch die Probenahme so hilfsbereit auf sich nahmen.

Frau Busse und Frau Kirchschlager habe ich zu danken für die zuverlässige Auswertung der mikrobiologischen Befunde und für die prompte Beantwortung diverser Fragen. Frau Kirchschlager übernahm zudem einen Teil der oft nervenaufreibenden Tätigkeit des Mikroskopierens.

Den Mitarbeitern des chemischen Labors der Klinik für Rinder gilt dafür zu danken, dass sie mir stets freundlich und zuvorkommend die benötigten Geräte zur Verfügung stellten. Auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunologie danke ich für die große Hilfsbereitschaft in fachlichen Fragen und die Herstellung von Bakteriensuspensionen und einigen hundert Litern Puffer.

Der Firma Boehringer sei auf diesem Wege ebenfalls für ihre Unterstützung gedankt.

Meinem lieben Lebensgefährten Manfred Krückeberg möchte ich nicht nur für die fachliche Betreuung der technischen Geräte und die geduldige Beantwortung unzähliger Fragen über Datenbänke und statistische Probleme, sondern vor allem für monatelanges Zuhören, Mitfiebern, Aufbauen und Trösten danken. Die Kombination kompetenter Beratung und einfühlsamer Motivation sucht seinesgleichen.

Ich danke meinen Eltern, Gerhard und Regine Merle, die mir das Studium und die Promotion so sorgenfrei wie möglich gestalteten. Ohne ihr liebevolles Vertrauen und ihre fortwährende Unterstützung wäre diese Arbeit nie vollendet worden. Meiner Schwester Franziska Merle danke ich für das intensive Lektorat meiner Dissertationsschrift und so manch aufmunterndes Wort.

Zuletzt muss ich auch meinem Sohn Daniel dafür danken, dass er mich – manchmal unsanft – an die wirklich wichtigen Dinge im Leben erinnerte.